

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL- UFRGS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**SÍNTESE DE β -AMINOÁLCOOIS DERIVADOS DO LIMONENO E AVALIAÇÃO
BIOLÓGICA *IN VITRO*.**

Dissertação apresentada por **Stela Regina
Ferrarini** para a obtenção do GRAU DE
MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientadores: Prof. Dr. Vera Lucia Eifler Lima
Prof. Dr. Ricardo Gomes da Rosa

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado – Pesquisa e Desenvolvimento de Matérias-Primas Farmacêuticas - da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 09.06.2008, pela Banca Examinadora constituída por:

Dr. Gilsane Lino Von Poser

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Jarbas Alves Montanha

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Valéria de Oliveira

Universidade Federal de Goiás

F375s Ferrarini, Stela Regina
Síntese de β -aminoálcoois derivados do limoneno e avaliação biológica in vitro / Stela Regina Ferrarini – Porto Alegre : UFRGS, 2008. – xviii, 169 p. : il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Limoneno. 2. β -aminoálcool. 3. Atividade leishmanicida. 4. Atividade carrapaticida. 5. Monoterpenos. I. Lima, Vera Lucia Eifler. II. Rosa, Ricardo Gomes da. III. Título.

CDU: 547.05

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB10/480

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal do Departamento de Produção de Matéria-Prima da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dr. Vera Lucia Eifler Lima, pela orientação, estímulo e confiança.

Ao Prof. Dr. Ricardo Gomes da Rosa pela co-orientação e participação nos trabalhos desenvolvidos no IQ.

À técnica Joice e os professores Tânia Pizzolato e Paulo Schneider pelas análises de RMN e CG.

Às professoras, Maria de Fátima Madeira, Suzana Zacchino, Vera Lúcia Sarda Ribeiro e Gilsane Von Poser pelos ensaios *in vitro*.

Aos professores do Pós-Graduação pelos ensinamentos passados.

Aos amigos e colegas de laboratório:

- Cedric, pela atenção e pelas centenas de idas e voltas do CG;
- Mônica, pelos momentos inesquecíveis de trabalho e amizade cultivados nesse tempo que passamos juntas;
- Rômulo pelo trabalho em conjunto e pela amizade;
- Thiago, pela amizade, pelos risos infinitos em seus shows de humor e
- Daiane pelas intensas cromatografias desenvolvidas e pela companhia.

Á minha super e inseparável amiga Taciana por sempre ter me apoiado e me dado forças para chegar até aqui.

Às minhas amigas, Denise e Tatiana pelo convívio, pela parceria e conversas descontraídas.

Ao meu namorado Paulo, pelo carinho, amor e por ser um constante exemplo de força e determinação para seguir adiante.

Aos meus pais pela vida, dedicação, amor e apoio incondicionais, e por serem meu admirável exemplo de vida a seguir.

Enfim, a presença de vocês foi muito gratificante.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 O limoneno.....	3
1.2 Atividades biológicas do limoneno e terpenos.....	5
1.2.1 Atividade contra Leishmaniose.....	5
1.2.2 Atividade antimalárica.....	6
1.2.3. Atividade inseticida.....	7
1.2.4 Atividade citotóxica e antitumoral.....	8
1.2.5 Atividade antimicrobiana e antifúngica.....	10
2 REFERÊNCIAS.....	13
3 OBJETIVOS.....	19
CAPÍTULO II. SÍNTESE DE β-AMINOÁLCOOIS Erro! Indicador não definido. 23	
1 INTRODUÇÃO.....	25
1.1 Limoneno como material de partida.....	28
1.1.1 Estudos anteriores do LaSOM.....	28
1.1.2 Estudos diversos.....	33
1.2 Abertura de epóxidos – formação de β -aminoálcoois.....	34
1.3 Biotransformação.....	36
2 OBJETIVO.....	39
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
3.1 Alterações reacionais desenvolvidas.....	47
3.1.1 Métodos reacionais.....	47
3.1.2 Aminas utilizadas.....	48
3.1.3 Tempo reacional.....	48
3.1.4 Catalisadores.....	48
3.1.5 Padrão interno.....	49
3.2 Sínteses em refluxo.....	49
3.2.1 Água destilada como catalisador.....	49
3.2.2 Ácido de Lewis como catalisador.....	54
3.3 Reações em microondas.....	56
3.3.1 Com água destilada como catalisador.....	57
3.3.2 Alumina neutra como catalisador.....	58
3.3.3 Avaliação da enantiosseletividade reacional.....	59
3.4 Purificação.....	60
3.4.1 Extrações líquido-líquido.....	60
3.4.2 Formação de enamina.....	60
3.4.3 Formação de cloridrato.....	61
3.4.4 Cromatografia em Coluna – CC.....	61
3.4.5 Destilação Fracionada em forno de bolas.....	62
4 PARTE EXPERIMENTAL.....	65
4.1 Materiais.....	67
4.2 Preparação dos produtos.....	67
4.2.1 Procedimento geral para a aminólise do óxido R-(+)-limoneno em refluxo.....	67
4.2.2 Preparação do diol.....	73
5 CONCLUSÕES.....	75
6 REFERÊNCIAS.....	79
CAPÍTULO III. ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	87
1 INTRODUÇÃO - Atividade Antifúngica.....	89

2 OBJETIVO.....	93
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
4 PARTE EXPERIMENTAL	101
4.1 Preparação das amostras	103
4.2 Microorganismos e meios.....	103
4.3 Testes de susceptibilidade antifúngica	103
5 CONCLUSÃO	105
6 REFERÊNCIAS	109
1 INTRODUÇÃO –Atividade Carrapaticida	113
2 OBJETIVO.....	119
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	123
4 PARTE EXPERIMENTAL	129
4.1 Compostos	131
4.2 Preparação das amostras.....	131
4.3 Preparação dos carrapatos	131
4.4 Efeito na eclosão dos ovos.....	131
4.5 Teste de imersão das larvas.....	132
5 CONCLUSÃO	133
6 REFERÊNCIAS	137
1 INTRODUÇÃO- Atividade Leishmanicida	141
2 OBJETIVO.....	145
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	149
4 PARTE EXPERIMENTAL	155
5 CONCLUSÃO	159
6 REFERÊNCIAS	163
IV ANEXOS.....	167

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Estudo reacional em refluxo com água destilada como catalisador.....	49
Tabela 2.2: Reações em refluxo com diversos AL como catalisadores	56
Tabela 2.3: Avaliação reacional efetuada em MO.	57
Tabela 2.4: Estudo reacional com alumina como catalisador.	58
Tabela 3.1: Atividade antifúngica encontrada frente a importantes fungos.....	97
Tabela 4.1: Resultados obtidos em índice de mortalidade (%) nos testes com os ovos do carrapato bovino <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	126
Tabela 4.2: Resultados obtidos em índice de mortalidade (%) nos testes com as larvas desse carrapato bovino expresso com índice de mortalidade (%).....	126
Tabela 5.1: Resultados obtidos nos testes efetuados nesse estudo.	152

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Biossíntese de terpenos	4
Figura 1.2: Limoneno e seus isômeros <i>R</i> e <i>S</i>	4
Figura 1.3: Exemplo de monoterpenos monocíclicos oxigenados onde o limoneno serve de precursor.....	9
Figura 1.4: Principais componentes do óleo essencial utilizados no estudo	11
Figura 2.1: Estrutura e isômeros do limoneno.....	27
Figura 2.2: Pontos de funcionalização do limoneno	27
Figura 2.3: Produtos sintetizados a partir do limoneno.....	30
Figura 2.4: Formas diastereoisoméricas do óxido de limoneno.....	35
Figura 2.5: β -aminoálcoois obtidos a partir de aminólise com aminas secundárias	36
Figura 2.6: Estados de transição das aminólises.	45
Figura 2.7: Cinética reacional com grande excesso de amina	52
Figura 2.8: Aminólise com óxido de limoneno <i>cis</i>	52
Figura 2.9: Análise em CG da reação do diol com a mistura <i>cis</i> e <i>trans</i>	53
Figura 2.10: Avaliação em CG da reação em refluxo com morfolina e água destilada	54
Figura 2.11: Abertura do epóxido <i>cis</i> e <i>trans</i> com AL como catalisador.....	54
Figura 2.12: Avaliação da seletividade das reações efetuadas em MO	59
Figura 2.13: Reação de formação e enaminonas e iminonas para retirada do excesso de amina do meio reacional	61
Figura 2.14: CCD do bruto reacional e da reação	62
Figura 3.1: Produtos testados para ação antifúngica	99
Figura 4.1: Ciclo de vida do carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	116
Figura 4.2: Produtos testados.....	125
Figura 4.3: Larvas dentro dos saquinhos para serem testadas	132
Figura 5.1: Ciclo de vida da leishmaniose	144
Figura 5.2: Produtos testados para atividade leishmanicida.....	151

LISTA DE ABREVIATURAS

AL: Ácido de Lewis

AniNH₂: anilina

BnNH₂: benzilamina

CC: cromatografia em coluna

CCD: cromatografia em camada delgada

DMAPP: Pirofosfato de dimetilalilo

Eq: equivalente, equivalentes

EtanoINH₂: etanolamina

FPP: Farnesil pirofosfato

FurfNH₂: furfurilamina

GGPP: Geranil geranil pirofosfato

GPP: Geranil pirofosfato

IPP: Pirofosfato de isopentenilo

IsoBuNH₂: isobutilamina

LaSOM: Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal

MO: microondas

MorfNH₂: morfolina

PiperNH₂: piperazina

PropNH₂: propilamina

PutNH₂: putrescina

t.r.: tempo de retenção

ToINH₂: toluidina

RESUMO

Nesse trabalho, foram sintetizados seletivamente, a partir do óxido do limoneno em oposição a diversas aminas primárias e secundárias, onze β -aminoálcoois derivados do limoneno através de aquecimento convencional e sob irradiação com microondas, fornecendo produtos com moderados a bons rendimentos.

O limoneno e nove destes aminoálcoois foram testados contra ovos e larvas de carrapatos da espécie de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no intervalo de concentração de 0,150-10 μ g/mL. Os resultados revelaram que em doses entre 10 μ l/ml - 2.5 μ l/ml todos os compostos testados foram letais às larvas. Frente ao teste ovicida os compostos **2**, **6**, **8**, **9** e **10** foram os mais ativos, impedindo a eclosão total ou quase total dos ovos na menor dose utilizada (0,150 μ g/ml). Este é o primeiro relato da atividade carrapaticida de limoneno, óxido de limoneno e dos β -aminoálcoois do limoneno para a espécie de carrapato *Rhipichephalus (Boophilus) microplus*.

O limoneno e sete β -aminoálcoois foram testados *in vitro* contra forma promastigota de *Leishmania (Vianna) braziliensis*. Os resultados dos testes mostraram que, dentre os sete β -aminoálcoois testados dois deles foram mais ativos que o padrão pentamidina (48,5 \pm 28,7 μ M) e cinco foram mais ativos que o limoneno **1**. Destes, dois deles (compostos **7** e **9**) apresentaram alta atividade frente a formas promastigotas do ciclo parasitário numa concentração de 0,156 μ g/mL. O Limoneno **1** nesse teste se mostrou inativo (876,2 \pm 216 μ M) demonstrando que este terpeno isolado não é um bom antiparasitário contra formas promastigotas de *Leishmania (Vianna) braziliensis*. Este é o primeiro relato de atividade contra leishmania para amino-álcoois derivados do limoneno.

Palavras-chave: limoneno, β -aminoálcool, síntese, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, leishmaniose, *Leishmania braziliensis*.

ABSTRACT

Synthesis of Limonene β -amino alcohol derivatives and *in vitro* biological evaluation.

In this work, a series of seven limonene β -amino alcohols derivatives have been regioselectively synthesized from moderate to good yields. The eleven β -amino alcohols Limonene derivatives were synthesized through aminólisis of Limonene oxide, using several primary and secondary amines by both conventional heating and under microwave irradiation.

Limonene, Limonene oxide and nine β -amino alcohol derivatives were investigated for the effect on egg hatchability and mortality rates of newly hatched larvae of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. At the doses between 10 μ l/ml to 2.5 μ l/ml all compounds were highly lethal to the larvae and at lower concentrations some of them (**2**, **6**, **8**, **9** and **10**) showed activity. The effect on hatchability of the eggs was observed in all treatments. This is the first report of carrapicide activity for Limonene, Limonene oxide and nine β -amino alcohol derivatives against cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

The leishmanicidal activity was performed and according to the results two of these compounds were more powerful against *in vitro* cultures of *Leishmania (Vianna) braziliensis* promastigote form in a range of μ M. The activities observed for **3b** and **3f** were about 100 folds more potent than the drug standard Pentamidine, while the limonene hasn't shown any activity in the same test. This is the first report of antileishmanial activity of Limonene β -amino alcohol derivatives.

Keywords: Limonene, β -amino alcohol, synthesis, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, leishmaniasis, *Leishmania braziliensis*.

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO GERAL

A química dos produtos naturais no processo de desenvolvimento de novos fármacos nas últimas décadas é inquestionável: estima-se que 40% dos novos fármacos aprovados nesse período tenham a sua origem em algum produto natural. Apesar desse percentual expressivo, a maioria das empresas farmacêuticas esteve, ao longo desta década, em busca de novas substâncias ativas. No futuro bem próximo, novos medicamentos serão lançados no mercado para tratar doenças que ainda não apresentam cura. Para isso, as áreas de Produtos Naturais e a Síntese Orgânica precisam responder aos novos desafios implantados.

1.1 O limoneno

Os terpenóides constituem uma grande variedade de compostos de origem vegetal. Esse termo é empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de uma unidade do isopreno, ordenados em cadeia, com rearranjos posteriores, sendo derivada do ácido mevalônico. Os esqueletos carbonados dos terpenos são formados pela condensação de um número variável de unidades pentacarbonadas (isoprênicas). Os compostos terpênicos mais comuns nos óleos voláteis são os monoterpenos (cerca de 90% dos óleos) e os sesquiterpenos.¹

Na figura 1.1 tem-se quatro etapas para a produção de isoprenóides. Na etapa 1, os monômeros IPP e DMAPP são sintetizados a partir de metabólitos primários. Posteriormente (etapa 2) ocorre condensação de cauda do IPP com uma unidade inicial de DMAPP gerando precursores fenildifosfato GPP, FPP e GGPP. Na terceira etapa, a terpeno sintetase catalisa a ciclização ou rearranja o esqueleto com perda de pirofosfato e, por fim, as enzimas elaboram o produto final.

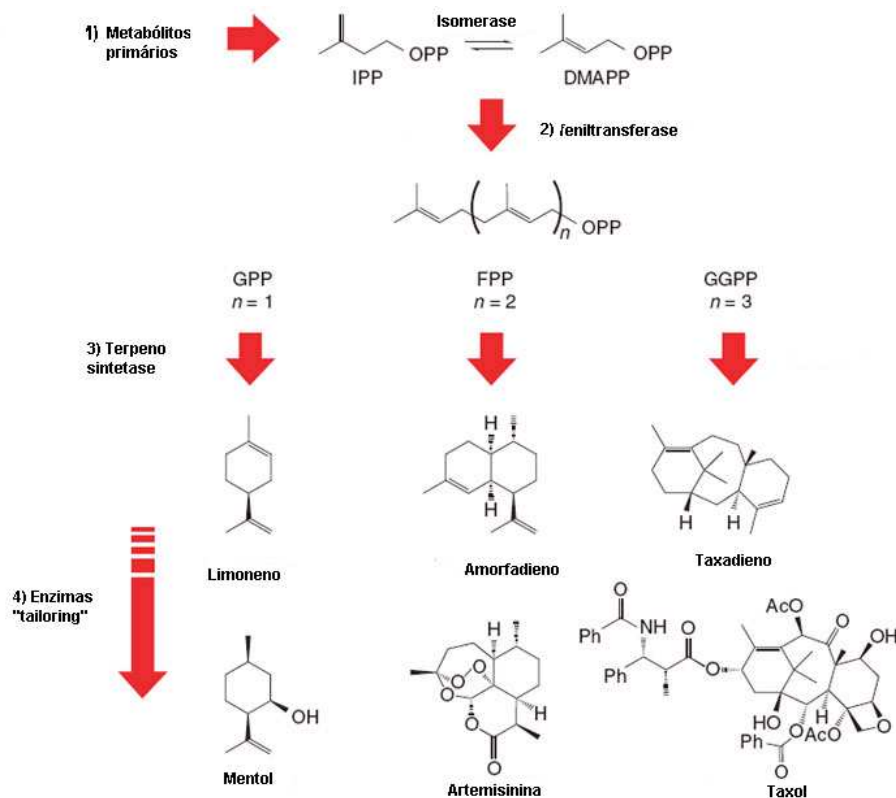


Figura 1.1: Biossíntese de terpenos.

O limoneno **1** (figura 1.2) pertence à classe dos terpenos e está presente majoritariamente na composição do óleo essencial de plantas cítricas.^{2,3} Ele é abundante no país, o que o torna um produto de fácil obtenção e baixo custo,⁴ utilizado igualmente como produto de partida para a síntese de compostos naturais e derivados.⁵ Além disso, seus derivados têm sido estudado com a intenção de se obter novos candidatos a fármacos.

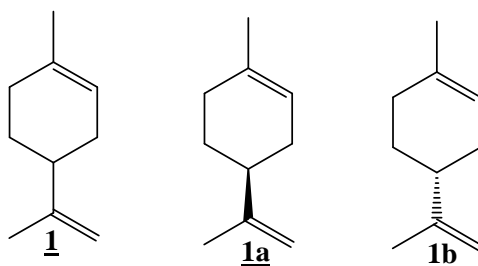


Figura 1.2: Limoneno e seus isômeros *R* e *S*.

1.2 Atividades biológicas do limoneno e terpenos

Em diversos estudos, o limoneno e seus derivados apresentaram interessantes atividades farmacológicas tais como: atividades antimicrobiana do óxido de limoneno, derivados do limoneno e óleo essencial contendo limoneno,⁶⁻⁸ atividade antifúngica de análogos sintéticos, do óxido de limoneno e óleo essencial,^{8,9} atividade antitumoral do limoneno, do óxido e derivados¹⁰⁻¹⁴ entre outras que serão mencionadas no decorrer do trabalho.

1.2.1 Atividade contra Leishmaniose

Leishmaniose é um grupo de desordens causada por parasitas do gênero *Leishmania*, um problema grave de saúde pública. As principais organizações estão preocupadas devido ao número significativo de casos e mortes em todo o mundo, principalmente em áreas subdesenvolvidas como África, Ásia e América Latina e surgimento em novas áreas¹⁵. Nessas regiões, o impacto econômico e social causado é muito alto, pois os parasitas infectam milhões de pessoas. A doença é endêmica em regiões tropicais do mundo, que infecta mais de 12 milhões de pessoas em 88 países e suas manifestações clínicas podem ocorrer nas formas cutânea, mucocutânea e visceral.¹⁶

É uma inflamação crônica devido à resposta ao sistema imune contra o parasita intracitoplasmática no macrófago ativado. O controle continua sendo um problema, porque não existem vacinas disponíveis e a quimioterapia ainda depende de compostos pentavalentes potencialmente tóxicos, que provocam efeitos secundários graves e exigem o tratamento de longo prazo.

Nos últimos anos, tem havido um interesse crescente em terapias alternativas e no uso de produtos naturais, especialmente os derivados de vegetais.¹⁷ E várias pesquisas estão em andamento com essas características.

Um estudo realizado *in vitro* por Rosa e colaboradores em 2003 com o óleo essencial das folhas da *Croton cajucara* (rico em linalol), frente à *Leishmania*

amazonensis forneceu novas perspectivas sobre o desenvolvimento de fármacos com atividade contra esse protozoário. Esse óleo essencial apresentou ser um potente composto leishmanicida, já que inibiu o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* em concentrações muito baixas (MIC = 85,0 pg/mL) e não apresentaram efeitos citotóxicos contra células de mamíferos.¹⁸

O limão, uma fruta que apresenta o limoneno como seu componente majoritário, apresentou atividade antiparasitária para mais de um parasita como *T. gallinarum* e *H. meleagridi*. E o óleo gálico isolado apresenta amplo espectro de ação para *Leishmania*, *Plasmodium*, *Giardia* e *Tripanossoma*.¹⁹ Com isso, tendo um composto de baixo custo e fácil aquisição o interesse na pesquisa de substâncias com atividade antiparasitária é crescente.

1.2.2 Atividade antimalárica

Malária é uma das principais doenças que ocorrem em países tropicais e subtropicais do mundo, com 1,5-3 milhões de doentes por ano e muitas são crianças.²⁰ O *Plasmodium falciparum* é o responsável por muitos casos fatais de malária e o mais virulento de quatro espécies com infecção humana. O maior sintoma clínico dessa enfermidade está na destruição de células vermelhas do sangue durante a multiplicação assexuada do parasita, levando à anemia ou citoaderência do parasita nos receptores endoteliais das plaquetas resultando em severas formas da malária.²¹

A cloroquina é um dos principais fármacos antimaláricos, mas a eficácia deste e de outros agentes quimioterápicos está se esgotando devido à resistência parasitária. Mefloquina é um potente composto extensivamente utilizado nos casos de resistência à cloroquina, mas sua resistência também está sendo observada. Portanto, o desenvolvimento de alternativas terapêuticas é necessário e urgente.²²

O estudo do mecanismo de ação mostrou que o *d*-limoneno apresentou atividade quimiopreventiva em roedores contra câncer de mama, pele, fígado, pulmão e de estômago,²³ possibilitando a interferência do metabolismo isoprenóide

desses tumores celulares especificamente na inibição da isoprenilação de proteínas 21-26 kDa, incluindo a proteína RAS.²⁴

A atividade na proliferação celular e a presença da proteína feniltransferase no *P. falciparum*, podem indicar o acesso do limoneno nas células do parasita. Moura e colaboradores em 2001 demonstraram que o estágio do ciclo do *P. falciparum* decresceu após tratamento com o limoneno por 72 horas, através de uma redução significativa da isoprenilação protéica possivelmente explicando a detenção do parasita atacado.²⁵

1.2.3. Atividade inseticida

Várias espécies vegetais são ricas em compostos secundários com ação inseticida destacando-se os monoterpenos e seus análogos. Estes compostos são tipicamente lipofílicos, tendo alto potencial de interferências tóxicas em processos bioquímicos básicos, com conseqüências fisiológicas e comportamentais em insetos.²⁶

Plantas, como organismos que co-evoluem com insetos e outros microorganismos, são fontes naturais de substâncias inseticidas e antimicrobianas, já que as mesmas são produzidas pelo vegetal em resposta a um ataque patogênico. As plantas sintetizam e emitem inúmeros compostos voláteis (ácidos, aldeídos e terpenos) para atrair polinizadores e se defender de herbívoros.²⁷

Em estudos, os compostos monoterpenóides têm apresentado diversas formas de ação para o controle de espécies de insetos-praga em grãos armazenados, como: de contato, por ingestão, como ovicida, umigante e repelente, além de afetarem a biologia dos insetos com mecanismo ainda não identificado.²⁸⁻³⁰

Monoterpenos como limoneno, linolol, terpineol, carvacrol e mircenol compõem muitos extratos de plantas e óleos essenciais com atividade inseticida.^{31,32} Jaenson e colaboradores em 2005 desenvolveram um importante trabalho avaliando a atividade repelente de óleos essenciais ricos em monoterpenos e sesquiterpenos.

Com três espécies de plantas: *Rhododendron tomentosum*, *Mirica gale* e *Artemisia absinthium* frente aos ovos de *Ixodes ricinus* Linnaeus exibiram resultados positivos, com atividade repelente variando entre 50 e 95% comparável com a substância comercializada, DEET (*N,N*-dimetil-*m*-tolumida).³³ Da primeira planta foram obtidos três quimiotipos de óleos (-)-limoneno (mais de 50%); mirceno (mais de 56%); e 32% de plustrol e 18% de ledol. O limoneno é utilizado como inseticida no controle de ectoparasitas e tem atividade contra insetos, microorganismos e ácaros.³⁴ Apresenta também alta atividade repelente frente ao *P. longiseti* e *F. selysi*, na concentração de 50 ng/μL.³⁵ Esse terpeno é tóxico para lagartas *D. pini* e para o besouro *Dendroctonus simplex* LeConte.³⁶

A habilidade de dominar muitos insetos em vários estágios do ciclo de vida sugere que o limoneno tenha uma proveitosa atividade protetora de grãos armazenados. Viabilidade de formulações e aplicações desse composto está sendo intensamente investigada.

1.2.4 Atividade citotóxica e antitumoral

Vários estudos demonstraram que os monoterpenos apresentam atividade antitumoral e sugerem que esses compostos sejam uma nova classe de agentes quimiopreventivos do câncer.^{12,37} O *R*-(-)- limoneno **1a** é o principal componente da casca de frutas cítricas e tem sido identificado como um agente não-tóxico com potencial para terapia do câncer.^{3,24} Serve de precursor para outros monoterpenos monocíclicos oxigenados como o caveol, carvona, mentol, álcool perílico e perilaldeído (figura 3).

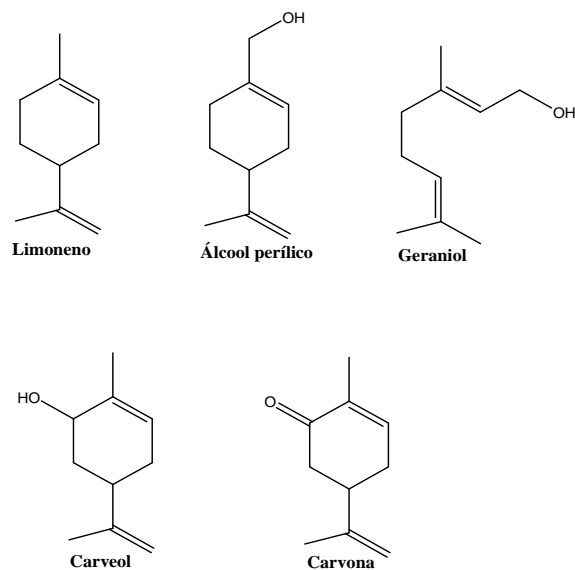


Figura 1.3: Exemplo de monoterpenos monocíclicos oxigenados onde o limoneno serve de precursor.

Esse monoterpeno **1** é extensivamente metabolizado *in vivo*. Em ratos, os dois metabólitos evidentes são ácido perílico e ácido diidroperílico.³⁸ Humanos produzem esse dois metabólitos além do limoneno 1,2-diol.¹² Ele inibe o desenvolvimento de tumores espontâneos e quimicamente induzidos em glândulas mamárias, fígado, pele, pulmão, estômago³⁹⁻⁴¹ e pâncreas de roedores,¹¹ bloqueando o crescimento de células cancerígenas, tanto *in vivo* quanto *in vitro*.¹² A atividade antitumoral parece ser citostática, o que é evidenciado pelo fato de que aproximadamente metade dos tumores reincidiu após a interrupção do tratamento durante seu estudo. O composto possui eficácia quimiopreventiva quando administrado a 5% na dieta, somente durante a fase de promoção e progressão do tumor. Seu único efeito adverso constatado é a perda de peso e a quimioterapia para tumores de mama induzidos por nitrosometiluréia (NMU) em ratos é mais efetiva quando utilizado juntamente com o inibidor de aromatase 4-hidroxiandrostenediona.¹²

O mecanismo de ação do limoneno **1** para a atividade quimiopreventiva e quimioterapêutica parece envolver alterações no metabolismo do isopreno. O efeito na proteína de isoprenilação é específico para espécies ou tipos de células. Desta maneira, poderia então inibir seletivamente a isoprenilação da proteína *Ras*, assim

como a da proteína G *in vivo*, enquanto que não exerce efeito na isoprenilação de muitas outras proteínas.

Essa inibição poderia alterar a localização intracelular das proteínas e por isso interromper sua atividade biológica. A sua eficácia na inibição de vários tipos de tumores *in vivo* deve-se ao fato de que o composto inibe a isoprenilação da proteína 21 a 26-kDa , incluindo a proteína Ras.^{42,43}

A atividade de dois quimiotipos do óleo essencial do fruto de *Angelica archangelica L.* foi avaliada, sendo observado que a presença da atividade citotóxica do óleo mostrou-se não dependente da quantidade de seus componentes.⁴⁴

1.2.5 Atividade antimicrobiana e antifúngica

Agentes antimicrobianos, incluindo conservantes de alimentos e ácidos orgânicos têm sido utilizados para inibir o crescimento de bactérias e ampliam a vida útil dos alimentos processados. Muitos componentes de ocorrência natural encontrados em plantas comestíveis e medicinais e em condimentos têm demonstrado funções antimicrobianas e poderiam servir como uma fonte de agentes ativos em alimentos.⁴⁵

O limoneno e alguns terpenos estruturalmente relacionados apresentaram interessantes atividades. Óleos essenciais de plantas contendo, entre outros, o limoneno são capazes de inibir o crescimento de bactérias e fungos.^{46,47} É importante ressaltar que, uma vez que o limoneno é o componente majoritário dos óleos essenciais de algumas plantas cítricas (podendo chegar à proporção de 96%)⁴⁷ não deve-se descartar a possibilidade de que a atividade antimicrobiana desses óleos possa estar relacionada com um provável sinergismo entre os vários terpenos existentes nos óleos. Kim e colaboradores testaram vários terpenos isolados contra microorganismos contaminantes de alimentos e certificaram-se que nas concentrações utilizadas (5 a 20% em 1% de tween 20) o limoneno não inibiu o crescimento de nenhum dos microorganismos,⁷ podendo indicar sinergismo entre os compostos.

O óleo essencial das folhas de *Sesuvium portuacastrum*, demonstrou, além de atividade antioxidante, atividade antifúngica para *Candida albicans*, atividade antibacteriana para *Acetobacter calcoacetica*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhii*, *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica* (figura 1.4).

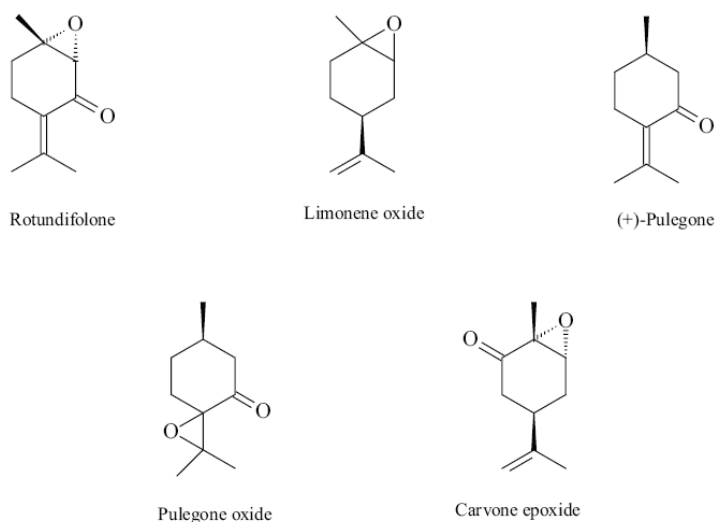


Figura 1.4: Principais componentes do óleo essencial utilizados no estudo.

Arruda e colaboradores avaliaram a atividade do óleo essencial de *Mentha x villosa* Hudson e de quatro análogos sintéticos de seu componente majoritário, rotundifolona, sendo um deles o epóxido de limoneno e observaram a presença de atividade contra bactérias gram-positivas, fungos e a ausência de atividade para gram-negativas.⁸

2 REFERÊNCIAS

1. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.L.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Ed. UFSC, 821p, 1999.
2. SHAW, P.E. Review of quantitative analyses of citrus essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 27, p. 246-257, 1979.
3. HARCATTLE, R. I.; ROWLANDS, M. G.; BARBER, A.M.; GRIMSHAW, R.M.; MOHAN, M.K.; NUTLEY, B.P.; JARMAN, M. **Biochemistry Pharmacology**, v.57, p. 801-809, 1999.
4. LISBALCHIN, M.; OCHOCKA, R. J.; DEANS, S.; ASZTEMBORSKA, M.; HART, S. Bioactivity of the enantiomers of limonene. **Medical Science Research**, v. 24, p. 309-310, 1996.
5. STANCIULESCU, M.; IKURA, M. Limonene ethers from tire pyrolysis oil. Part 1: Batch experiments. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 75, p. 217-225, 2006.
6. GRAEBIN, C.; LIMBERGER, J.; ROSA, R. M.; EIFLER-LIMA, V. L. The use of limonene and limonene oxide as building-block for solid phase combinatorial synthesis. In: **The 2nd Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry - BrazMedChem**, Rio de Janeiro, v. 44, p. S2- 42, 2004.
7. KIM, J.; MARSHALL, M.R.; WEI, C.I. Antibacterial activity of some essential oils components against five foodborne pathogens. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 43, p. 2839-2845, 1995.
8. ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P.; CATÃO, R.M.R.; LIMA, E.O.; SOUZA, D.P.; NUNES, X.P.; PEREIRA, M.S.V.; BARBOSA-FILHO, J.M.; da CUNHA, E.V.L. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, p 307-313, 2006.
9. BELETTI, N.; NDAGIJIMANA, M.; SISTO, C.; GUERZONI, M. E.; LANCIOTTI, R.; GARDINI, F. Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6932-6938, 2004.
10. AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. Inflammation and cancer: How hot is the link? **Biochemical Pharmacology**, v. 72, p. 1605-1621, 2006.
11. UEDO, N.; TATSUTA, M.; LISHI, H.; BABA, M.; SAKAI, N.; YANO, H.; OTANI, T. Inhibition by d-limonene of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N0-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. **Cancer Letters**, v. 137, p. 131-136, 1999.
12. CROWEL, P. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **American Society for Nutritional Sciences**, v. 129, p. 775S-778S, 1999.

13. MORSE, M.A.; TOBUREN, A.L. inhibition of metabolic activation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by limonene. **Cancer Letters**, v. 104, p. 211-217, 1996.
14. CHEN, J.; LU, M.; JING, Y.; DONG, Y. The synthesis of L-carvone and limonene derivatives with increased antiproliferative effect and activation of ERK pathway in prostate cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v 14, p 6539-6547, 2006.
15. NWAKA, S., HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, p. 941-955, 2006.
16. (a) CROFT, S. L.; YEARDLEY, V. **Current Pharmaceutical Design**. v.8, p. 319-342, 2002. (b) MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, p.1561-1577, 2005.
17. RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p.603-613, 2001.
18. ROSA, M.S.S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; BIZZO, H. R.; SOARES, R. M. A.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C.S.; LOPES, A.CH.C.L. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, p.1895–1901, 2003.
19. ANTHONY, J.P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components-a resource for antiparasitic agents? **TRENDS in Parasitology**, v.21, p.462-468, 2005.
20. RODRIGUES, J.R.; DOMÍNGUEZ, N.G. *Plasmodium berghey*: *In vitro* and *in vivo* activity of dequalinium. **Experimental Parasitology**, v. 115, p. 19-44, 2007.
21. MILLER, L. H.; GOOD, M. F.; MILON, G. Malaria pathogenesis. **Science**, v.264, p.1878–1883, 1994.
22. AYAD, F.; TILLEY, L.; DEADY, L.W. Synthesis, antimalarial activity and inhibition of haem detoxification of novel bisquinolines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.11, p. 2075-2077, 2001.
23. BARDON S.; PICARD K.; MARTEL P. Monoterpenes inhibit cell growth, cell cycle progression, and cyclin D1 gene expression in human breast cancer cell lines. **Nutrition and Cancer**, v. 32, p.1–7, 1998.
24. CROWELL, P. L.; CHANG, R. R.; REN, Z. B.; ELSON, C. E.; GOULD, M. N. Selective inhibition of isoprenylation of 21- to 26-kDa proteins by the anticarcinogen d-limonene and its metabolites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p.17679–17685, 1991.
25. MOURA, I. C.; WUNDERLICH, G.; UHRIG, M. L.; COUTO, A. S., PERES, V. J.; KATZIN, A. M.; KIMURA, E. A. Limonene arrest parasite development and inhibits isoprenylation of proteins in *Plasmodium falciparum*. **American Society for Microbiology**, v. 45, p. 2553-2558, 2001.

26. PRATES, H.T.; SANTOS, J. P. Óleos essenciais no controle de pragas de grãos armazenados. p. 443-461. In: LORINI, I.; MIKE, L.H.; SENSSEL, V.M. (eds.), Armazenagem de grãos. Campinas: **Instituto Bio Geneziz**, 1000p, 2002.
27. ERAN, P.; JONATHAN E. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.237, 2002.
28. KARR, L.L.; COASTS, J.R. Insecticidal properties of d-limonene. **Journal of Pesticide Science**, v. 13, p. 287-289, 1988.
29. RICE, P.J.; COASTS, J.R. Insecticidal properties of several of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and southern maize rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 87, p.1172-1179, 1994.
30. LEE, S.; PETERSON, C.J.; COASTS, J.R. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. **Journal of Stored Products Research**, v.39 p.77-85, 2003.
31. REGNAULT-ROGER C.; HAMRAOUI, A. Fumigant toxic activity and reproductive inhibition induced by monoterpenes on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera), a bruchid of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Stored Products Research**, v.31, p.291–299, 1995.
32. AHN Y.J.; LEE S.B.; LEE H.S.; KIM G.H. Insecticidal and acaricidal activity of carvacrol and β -thujaplicine derived from *Thujopsis dolabrata* var. *hondai* sawdust. **Journal of Chemical Ecology**, v.24, p. 81–90, 1998.
33. JAENSON, T.G.T.; PÅLSSON K.; BORG-KARLSON A.K. Evaluation of extracts and oils of tick-repellent plants from Sweden. **Medical and Veterinary Entomology**, v.19: p. 345-352, 2005.
34. IBRAHIM, M.A.; KAINULAINEN, P.; AFLATUNI, A.; TIILIKKALA, K.; HOLOPAINEN, J.K. Insecticidal, repellent, antimicrobial and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. **Agricultural Food Science in Finland**, v.10, p. 243–259, 2001.
35. FRANCISCA, R.; ABRAHAM, H.; ALAIN, L.; WITTKO, F.; ALBERTO, T. Dufour's gland secretion as a repellent used during usurpation by the slave-maker ant *Rossomyrmex minuchae*. **Journal of Insect Physiology**, v. 51, p.1158-1164, 2005.
36. WERNER, R.A. Toxicity and repellency of 4-allylanisole and monoterpenes from white spruce and tamarack to spruce beetle and eastern larch beetle (Coleoptera: Scolytidae). **Environmental Entomology**, v. 24, p. 372–379, 1995.
37. ELSON, C.E.; YU, S.G. The chemoprevention of cancer by mevalonate- derived constituents of fruits and vegetables. **The Journal of Nutrition**. v.124, p. 607-614, 1994.

38. CROWELL, P.L.; LIN, S.; VEDEJS, E; GOULD, M. N. Identification of metabolites of the antitumor gent d-limonene capable of inhibiting protein isoprenylation and cell growth. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 31, p. 205-212, 1992.
39. ELEGBEDE, J.A.; MALTZMAN, T.H.; VERMA, A.K.; TANNER, M.A.; ELSON, C.E.; GOULD, M. N. Mouse skin tumor promoting activity of orange peel oil and d-limonene: a re-evaluation. **Carcinogenesis**, v.7, p. 2047-2049, 1986.
40. WATTENBERG, L.W.; COCCIA, J.B. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1 butanone carcinogenesis in mice by d-limonene and citrus fruit oils. **Carcinogenesis**, v.12, p.115-117, 1991.
41. KAWAMORI, T.; TANAKA,T.; HIROSE, Y.; OHNISHI, M.; MORI, H. Inhibitory effects of d-limonene on the development of colonic aberrant crypt foci induced by azoxymethane in F344 rats. **Carcinogenesis**, v.17, p. 369-372, 1996.
42. GELB, M. H.; TAMANOI, F.; YOKOYAMA, K.; GHOMASHCHI, F.; ESSON, K.; GOULD, M. N. The inhibition of protein prenyltransferases by oxygenated metabolites of limonene and perillyl alcohol. **Cancer Letters**, v. 91, p. 169–175, 1995.
43. HOHL, R. J.; LEWIS, K. Differential effects of monoterpenes and lovastatin on RAS processing. **Journal Biological Chemistry**, v.270, p.17508–17512, 1995.
44. SIGURDSSON S; OGMUNDSDOTTIR HM; GUDBJARNASON S. The cytotoxic effect of two chemotypes of essential oils from the fruits of *Angelica archangelica* L. **Anticancer Research**, v.25 p.1877-1880, 2005.
45. DUARTE, M. O. As propriedades farmacológicas do limoneno e de seus derivados. **Trabalho de Conclusão**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 34p, 2004.
46. DEANS, S.G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 5, p. 165-180, 1987.
47. CACCIONI, D. R. L.; GUIZZARDI, M.; BIONDI, D. M.; RENDA, A.; RUBERTO, G. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 73-79, 1998.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Em vista do potencial terapêutico do limoneno como agente antiparasitário, esta dissertação objetiva realizar a síntese em solução (sob refluxo e sob irradiação de microondas) de derivados aminados deste terpeno, β -aminoálcoois, empregando o óxido de limoneno como material de partida. Para isso serão variados reagentes e condições reacionais de modo a obter compostos com altos rendimentos e seletividade.

Objetiva-se igualmente iniciar uma avaliação das atividades biológicas *in vitro* para funções leishmanicida, fungicida e carrapaticida dos compostos sintetizados.

O plano escolhido para descrever este trabalho foi o seguinte:

□ **CAPÍTULO II:** Realização e otimização da síntese de β -aminoálcoois empregando diversos protocolos.

□ **CAPÍTULO III:** Avaliação biológica do limoneno e dos diversos aminoálcoois sintetizados.

CAPÍTULO II. SÍNTESE DE β -AMINOÁLCOOIS

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O limoneno **1** é chamado quimicamente de 4-isopropenil-1-metilcicloexeno ou p-menta-1,8-dieno (IUPAC). Por apresentar um carbono assimétrico pode ser obtido como o isômero *S*(-) (**1a**) do capim-limão e o isômero *R*(+) (**1b**) a partir do limão e da laranja (figura 1) ^{2,3}.

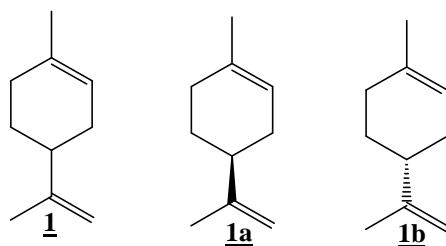


Figura 2.1: Estrutura e isômeros do limoneno.

Este terpeno apresenta duas ligações duplas na sua estrutura química que podem ser funcionalizadas: uma na porção isoprenila e a outra endocíclica. A figura 2.2 mostra em destaque as duas áreas da estrutura do limoneno como as principais fontes de funcionalização do mesmo (criação de diversidade).

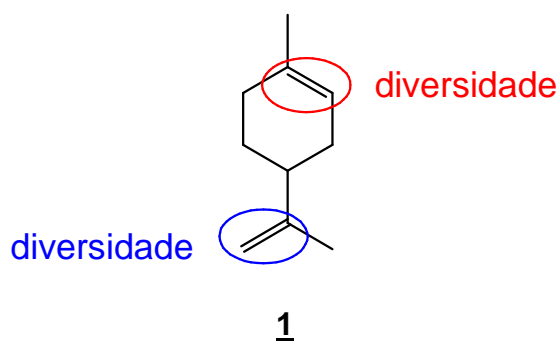


Figura 2.2: Pontos de funcionalização do limoneno.

1.1 Limoneno como material de partida

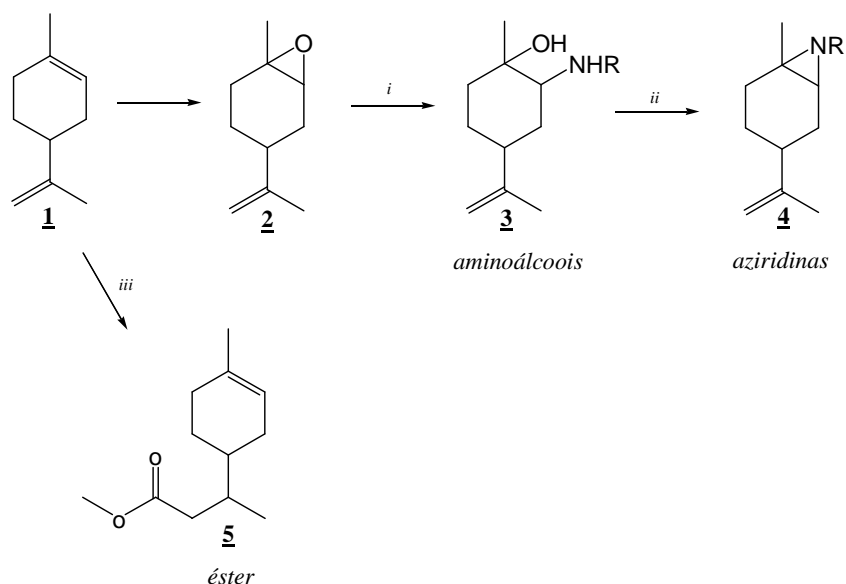
Na literatura são relatadas diversas utilizações do limoneno **1** como composto-protótipo, ou mesmo, várias atividades farmacológicas desse terpeno e de seus derivados. Apresenta uma vasta aplicação na indústria de química fina, indústria cosmética para confecção de aromas e essências³ também vem atraindo muita atenção dos químicos medicinais na pesquisa de novos candidatos a fármacos.

1.1.1 Estudos anteriores do LaSOM

Diversas substâncias biologicamente ativas de origem natural possuem átomos de nitrogênio em suas estruturas, sendo empregados na preparação e formulação de diversos produtos e bens de consumo, como fármacos, artigos de higiene, insumos agrícolas e materiais de uso doméstico ou industrial. A importância de compostos nitrogenados em síntese vem motivando o desenvolvimento de novas estratégias para a introdução seletiva de grupos funcionalizados, a partir de metodologias simples envolvendo condições reacionais brandas, alta economia atômica, reagentes e produtos pouco ou atóxicos, geração mínima de resíduos e reduzido impacto ambiental.

O LaSOM trabalha com produtos naturais almejando o desenvolvimento de novas substâncias que apresentem atividades biológicas interessantes, agregando valor aos seus derivados, uma vez que são sintetizados a partir de uma fonte natural barata e abundante em nosso país, como é o caso do limoneno.

Limberger sintetizou quatro aminoálcoois através da aminólise dos óxidos de limoneno e cicloexeno com alilamina e anilina, catalisada por água destilada. A partir desses formou-se aziridinas e com o limoneno também se produziu éster (esquema 1).⁴



Esquema 1: Condições: *i*) óxido de limoneno, água destilada/alumina, amina, 80°C, 18-24 horas; *ii*) PPh₃Br₂, NEt₃, MeCN; *iii*) Co/MeOH, Pd(PPh₃)₂Cl₂/SnCl₂, benzeno, 100°C, 16h.

Os aminoálcoois sintetizados foram: 2-(alilamino)-4-isopropenil-1-metilcicloexanol **6**, 2-(anilino)-4-isopropenil-1-metilcicloexanol **7**, 2-(alilamino)-cicloexanol **8** e 2-(anilino)-cicloexanol **9**.

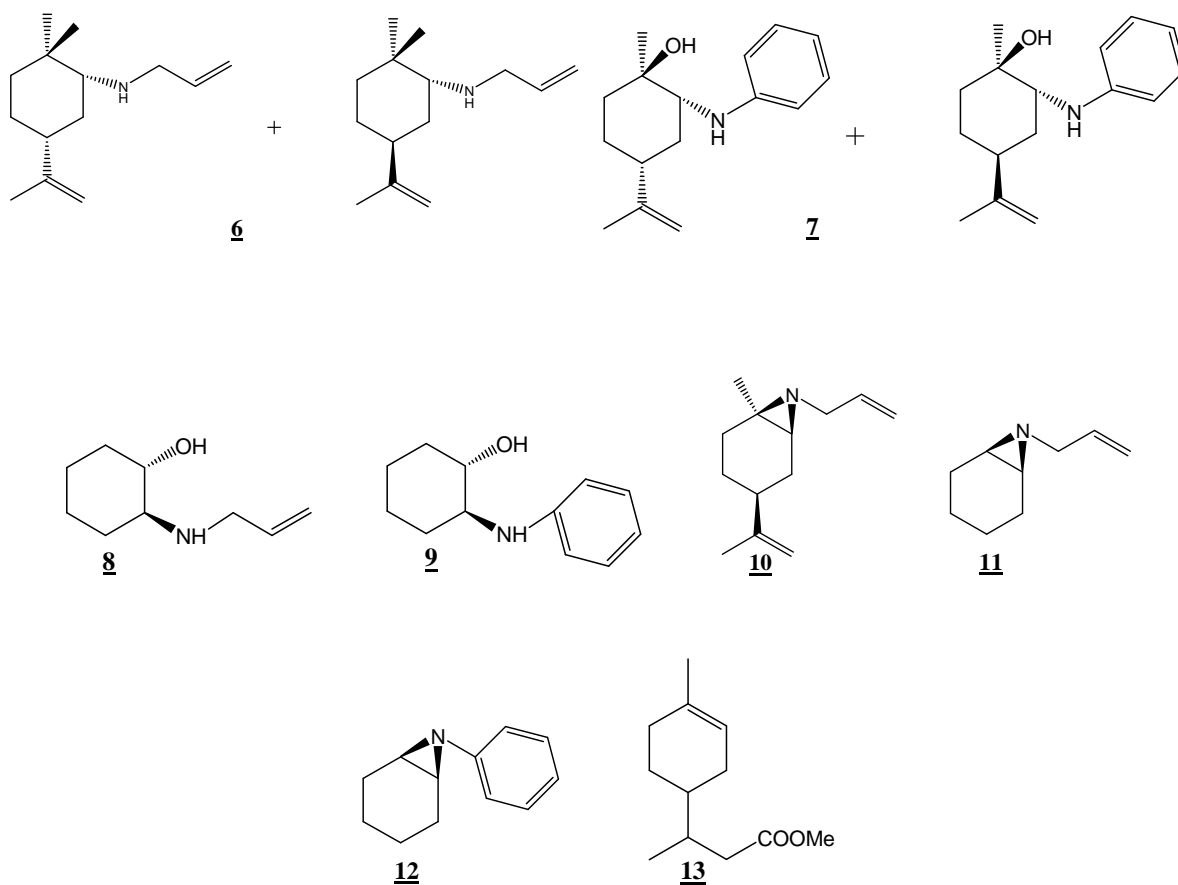


Figura 2.3: Produtos sintetizados a partir do limoneno

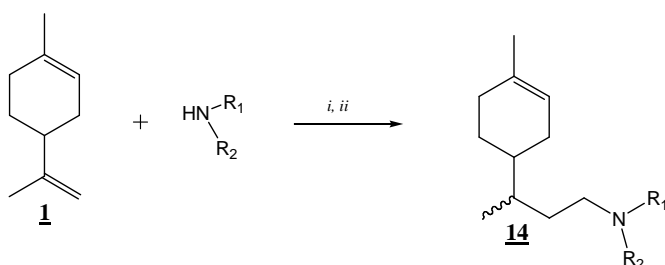
Para a síntese do aminoálcool **8** (figura acima) foi utilizado também a técnica descrita por Onaka *et al* em 1985,⁵ o catalisador utilizado nesse caso, foi a alumina básica ativada. E a partir desses aminoálcoois produziu-se a aziridina 7-aliil-4-isopropenil-1-metil-7-azabicyclo[4.1.0]heptano **10** além das aziridinas **11** e **12** derivadas do aminoálcool do cicloexeno.

Limberger, Graebin e colaboradores^{4,6} desenvolveram também a metoxicarbonilação catalítica do **1a**, utilizando catalisador de Paládio. Esta reação foi realizada com base na literatura e o éster formado, o metil butanoato de 3-(4-metilcicloex-3-en-1-ila) **13**, foi isolado com rendimentos de 25 %.⁷

Com os compostos **6**, **7**, **8**, **11** e **13** foi avaliada a atividade antibacteriana contra *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*.

Todos os compostos apresentaram boa inibição do crescimento bacteriano frente ao *Micrococcus luteus* superior ao *tamplate*, limoneno, que não apresentou essa atividade.

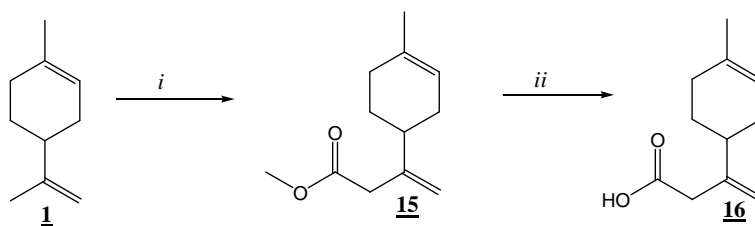
Recentemente Graebin *et al* realizaram hidroaminometilação e metoxycarbonilação da porção isoprenila do limoneno.⁸ Na primeira, utilizou alquilaminas, amins cíclicas e diaminas gerando 7 derivados com bons rendimentos. As reações foram realizadas com a mistura de **1**, catalisador HRh(CO)(PPh₃)₃, amina e THF sob argônio em um reator autoclave pressurizado a 100°C por 5 horas, com rendimentos de 44 a 85% (Esquema 2).



14a: R₁= n-propil, R₂=H
14b: R₁= i-propil, R₂=H
14c: R₁= benzil, R₂=H
14d: R₁/ R₂=piperidina
14e: R₁/R₂=morfolina
14f: R₁/R₂=piperazina
14g: R₁=fenila, R₂=H

Esquema 2: Condições: HRhCO(PPh₃)₃, THF; *i*) CO (20 bar), H₂ (20 bar), 100°C, 5h; *ii*) H₂ (40 bar), 100°C, 10-19 h.

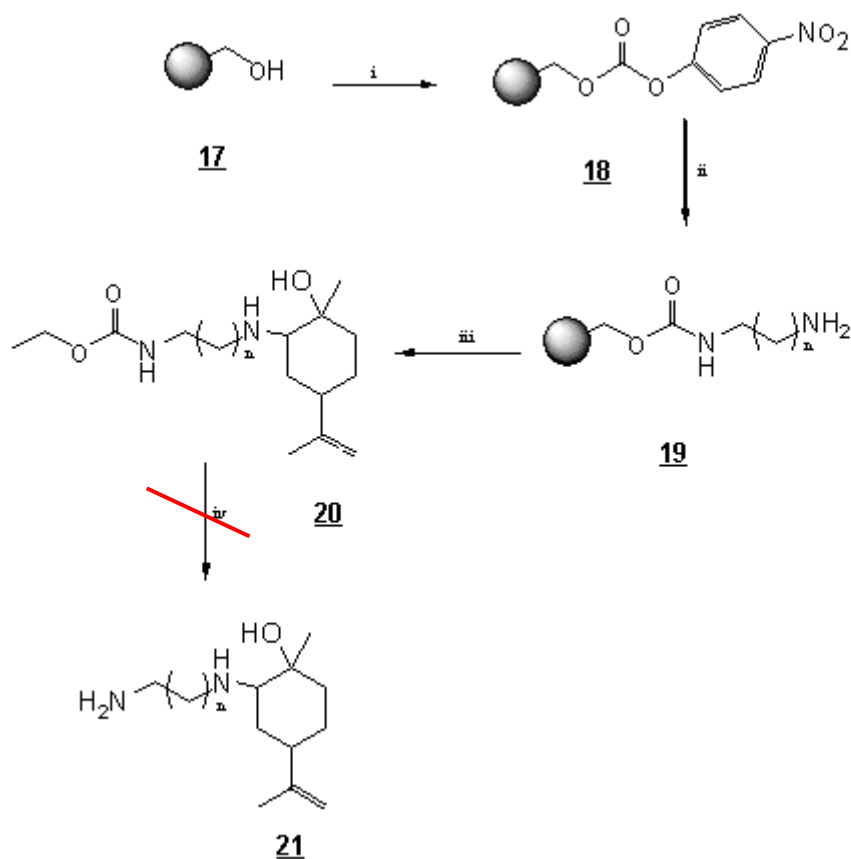
A metoxycarbonilação do limoneno gerou o éster **15** com 25% de rendimento que seria então hidrolisado para a obtenção de **16** (esquema 3). Embora a reação tenha ocorrido com sucesso em algumas tentativas, não se apresentou confiável quanto à sua reprodutibilidade.



Esquema 3: Metoxilação da porção isoprenila do limoneno. Condições: *i*) PdCl₂(PPh₃)₂, (cat.), *p*-TsOH, CO, Metanol, Tolueno, 100°C, 24h. *ii*) KOH 3M, etanol/água 1:5, 14h temp. ambiente.

Visto as dificuldades encontradas na purificação de alguns β-aminoálcoois durante a síntese, Canto desenvolveu estudos de aminólise com diaminas em Fase Sólida (SOFS), um ramo da Síntese Orgânica de interesse crescente.⁹ Nela, utiliza-se um polímero inerte (resina) que se liga covalentemente ao produto de partida (acoplamento) gerando o intermediário reacional sem impurezas. Outro fator importante é a facilidade na purificação desse intermediário; com uma simples lavagem está pronto para a próxima etapa. A clivagem, processo de separação do produto e polímero, é a última etapa da síntese. Visto ser uma boa alternativa para contornar a limitação, a síntese foi desenvolvida por SOFS.

No esquema 4 observa-se que a resina Wang **17** reage primeiramente com o *p*-nitrofenilcloroformato na presença de piridina para formação do carbonato ativado ligado à resina, **18**. O tratamento desta resina **18** com um excesso das diaminas levou à formação do respectivo carbamato **19**. Estando as diaminas acopladas à resina, procedeu-se à abertura do epóxido do limoneno para a formação do produto **20**. Com o β-aminoálcool formado restava apenas a etapa de clivagem dessa resina, liberando o produto puro. Para que essa etapa ocorresse com sucesso seria necessário a utilização da clivagem ácida, assim acreditou-se que todas as alternativas foram destrutivas para a estrutura do limoneno. Não tendo sucesso na etapa de clivagem.



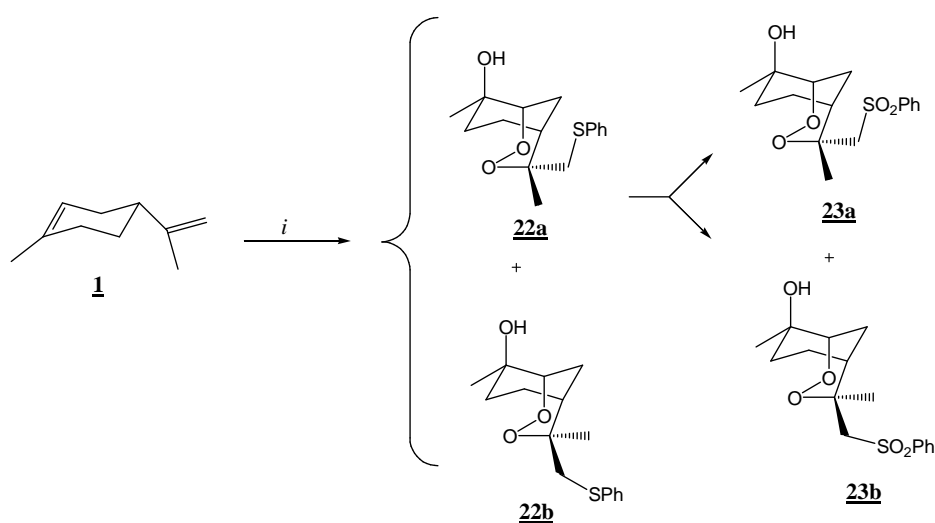
Esquema 4: Condições: *i*) p-Nitrofenilcloroformato (3 eq.), piridina (1,5eq.), DCM, 45 min., temp. ambiente; *ii*) diamina (10 eq.), DCM, 2h, temp. ambiente; *iii*) óxido de limoneno (5eq.), H₂O (0,8eq.), DCM, MO 2-4 min. 300W; *iv*) ácido trifluoroacético, DCM, H₂O, temp. ambiente, 3h.

1.1.2 Estudos diversos

Em 1996, Lee e colaboradores¹⁰ partiram do óxido do limoneno **2** para gerar o sesquiterpeno (-)-Clavukerin A um produto natural de origem marinha isolado do coral *Clavularia koellikeri*.¹¹

Solabannavar *et al* em busca de otimizar a síntese do composto natural, o Norbisabolideo isolado da casca da raiz de *Atalantia monophylla* relatou uma breve e eficiente síntese desse composto.^{12,13} O Norbisabolideo já havia sido sintetizado em 1983 a partir do limoneno **1** em oito etapas.¹⁴ Esse terpeno também foi convertido em norbisabolideo por Fukamiya com rendimentos entre 7% e 43%.¹⁵

Foram sintetizados também compostos com interessantes atividades, como no caso de endoperóxidos relacionados estruturalmente com o composto natural yingzhaosu A em duas etapas (esquema 5).¹⁶ Nessa síntese, os endoperóxidos **22a** e **22b** foram obtidos a partir de **1** num processo multicomponente envolvendo co-oxidação do terpeno seguido da redução seletiva. A oxidação com *m*CPBA levou aos **23a** e **23b**, compostos esses que apresentaram importante atividade antimalárica.



Esquema 5: Condições: *i*) 1- PhSH, O₂, DBPO; 2- Ph₃P; *ii*) *m*CPBA, temp. ambiente.

1.2 Abertura de epóxidos – formação de β-aminoálcoois

Aminoálcoois são versáteis intermediários sintéticos para geração de uma gama de produtos, são muito utilizados na adição enantiosseletiva de reagentes organozinco a aldeídos e cetonas,^{17,18} além da síntese assimétrica¹⁹. Epóxidos enantiomericamente puros são sintetizados usualmente para a produção de muitos compostos quirais não racêmicos.^{17,20} O óxido de limoneno é comercialmente disponível e relativamente barato, sendo encontrado em uma mistura de epóxidos *cis* e *trans* na proporção 1:1 (Figura 2.4).²¹

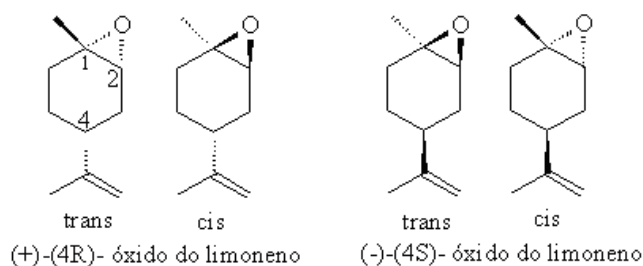
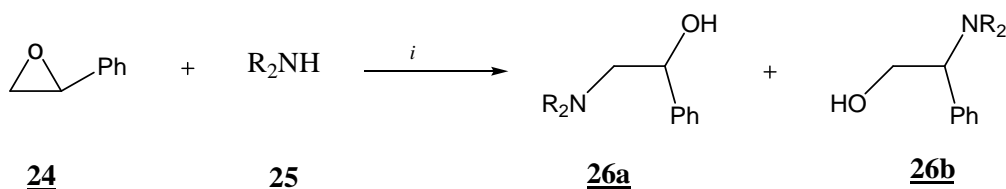


Figura 2.4: Formas diastereoisoméricas do óxido de limoneno

A abertura do epóxido com uma amina, a aminólise, é reconhecida como uma importante rota para se obter aminoálcoois com estereoquímica 1,2 *trans*.^{19,22} Essa síntese apresenta inconveniências, tais como longos tempos reacionais, excesso de amina, reação em alta temperatura, moderados rendimentos e exigência de estereoquímica do catalisador.^{19,22-27} Por isso, foram desenvolvidas algumas alternativas para reverter esses problemas¹⁵ que incluem a utilização de alumina,^{5,28} amidas metálicas,²⁹ metais alcóxidos,³⁰ sais metálicos,³¹ sílica sob alta pressão,²⁴ sob irradiação de microondas com K10,³² entre outros.

Dentre os promotores citados, Onaka e colaboradores⁵, Posner e colaboradores²⁸ publicaram que a alumina catalisa especificamente o isômero *trans* da mistura enantiomérica e que o mecanismo parece ser concertado, envolvendo simultânea polarização da ligação C-O do epóxido e ativação do nucleófilo pelo promotor.

Mojtahedi e colaboradores, utilizando reator de microondas e um promotor potente como a montmorilonita K10, sem solvente, levam à mistura de produtos (baixa regio e estereoespecificidade), como é observado no esquema 6.³² O epóxido **24** foi tratado com aminas primárias e secundárias **25** em presença da argila montmorilonita K10 sob radiação de microondas sem qualquer solvente, levando aos β -aminoálcoois **26a** e **26b**.



Esquema 6: argila K10, MO, sem solvente, 1 min.

Tanto Chrismann quanto Steiner efetuaram estudos de aminólises com o óxido de limoneno **2**, aminas secundárias e água como catalisador sob refluxo, obtendo 9 aminoálcoois, comprovando a diastereosseletividade para o isômero *trans* (figura 2.5).^{17,21}

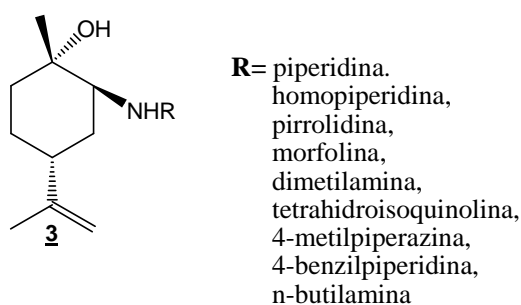


Figura 2.5: β-aminoálcoois obtidos a partir de aminólise com aminas secundárias

Não é apenas através da síntese convencional que ocorre a conversão enantiosseletiva do óxido de limoneno **2**: bactérias, enzimas e fermentos têm sido também utilizados para a bioconversão, permitindo o isolamento preferencial de um dos isômeros^{33,34}.

1.3 Biotransformação

Muitos estudos foram encontrados na literatura sobre biotransformação de terpenos, sendo que a grande maioria descrita até o momento é em escala de bancada, sendo inviável do ponto de vista industrial. Pois sua aplicação direta em escalas maiores esbarra nas baixas concentrações dos produtos finais e intermediários devido à volatilidade do substrato, além da instabilidade e toxicidade

do limoneno aos microorganismos em geral.^{35,36} A recuperação dos produtos voláteis biotransformados apresenta problemas e o método mais promissor é a extração de bioaromas *in situ* utilizando avançadas técnicas de separação.³⁷ Há, portanto, a necessidade de desenvolvimento de técnicas mais específicas aplicáveis *in loco* e em condições de esterilidade. Nos últimos cinco anos observou-se significativos progressos no campo da biotransformação de limoneno, especialmente no que se refere à regioespecificidade da biocatálise por microorganismos.

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

Considerando a importância do limoneno, o presente trabalho tem como objetivo utilizá-lo como *template*, visando a síntese em solução de β -aminoálcoois a partir do óxido de limoneno empregando aquecimento convencional e irradiação das microondas e posteriormente testá-los *in vitro*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A síntese de β -aminoálcoois foi baseada nos trabalhos desenvolvidos por Chrismann e por Steiner,^{17,21} os quais demonstraram eficácia na utilização de água como catalisador reacional para abertura diastereosseletiva do óxido de limoneno *trans* com aminas secundárias.

A seletividade destas reações pode ser explicada pelas diferenças conformacionais entre os diastereoisômeros *cis* e *trans*.^{17,21,38} Devido às restrições estéricas, o grupamento isopropenila “prefere” a orientação equatorial tanto no isômero *cis* quanto no isômero *trans*. Para o isômero *trans* ocorre a abertura do epóxido através de um mecanismo “ $\text{S}_{\text{N}}2$ like” por aminas nucleofílicas no C-2 menos impedido, *via* um estado de transição termodinamicamente estável tipo cadeira. Por outro lado, para que ocorresse o mesmo ataque no C-2 do isômero *cis*, este deveria passar por um estado de transição energeticamente desfavorável tipo bote. Com as condições utilizadas, o isômero *cis* é recuperado intacto ao final da reação (Figura 2.6).

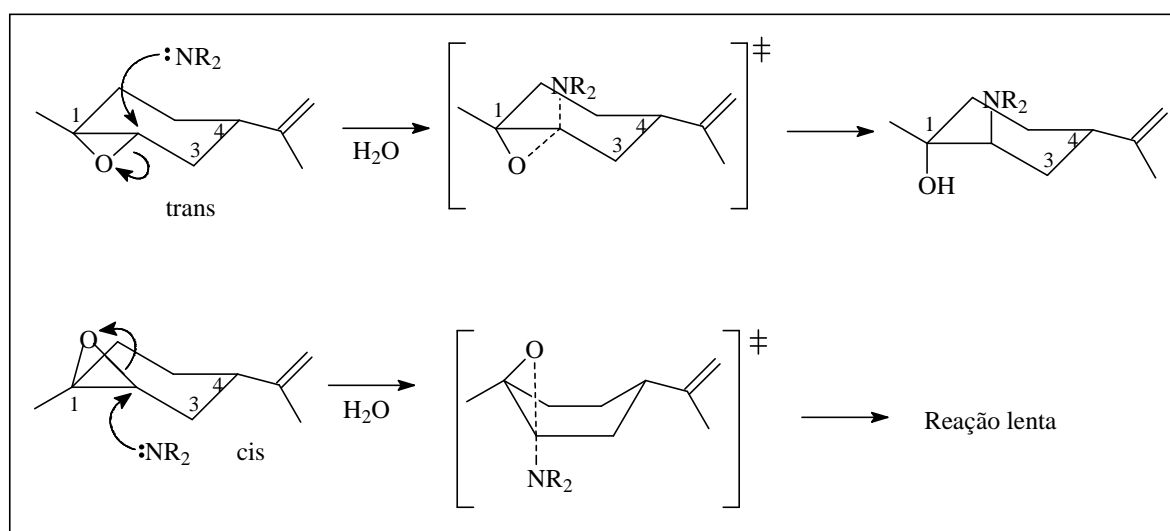
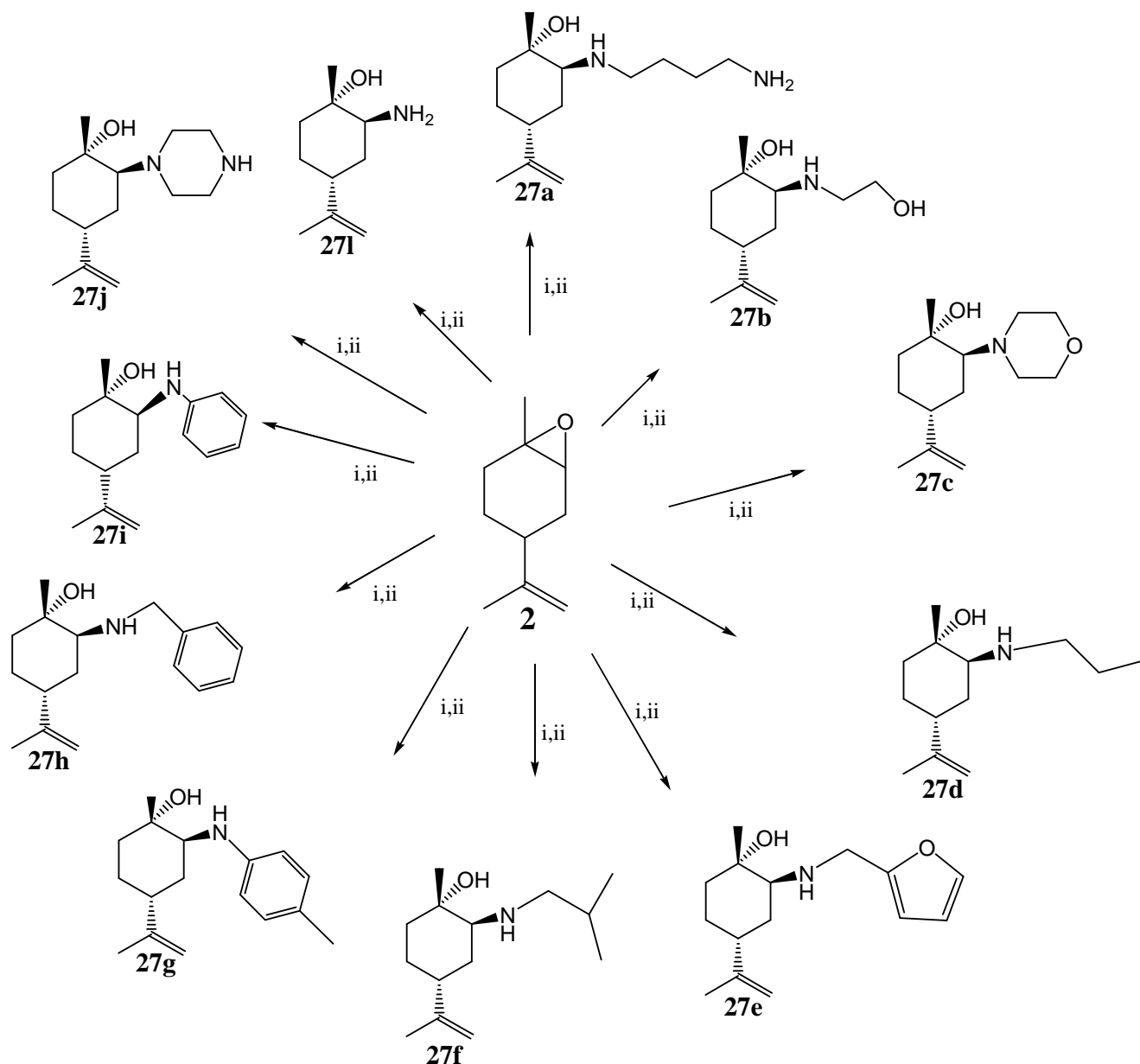


Figura 2.6: Estados de transição das aminólises. (Adaptado de Steiner).²¹

As pesquisas realizadas com o uso de outros catalisadores reacionais basearam-se em trabalhos onde a alumina foi seletiva entre os isômeros,^{5,28} porém nesses estudos não foi utilizado o óxido de limoneno. Mojtahedi e colaboradores³² comprovaram que microondas e argila K10 geram misturas de produtos, sendo utilizada então alumina neutra como catalisador tentando não gerar misturas de produtos.

O presente trabalho foi desenvolvido com aminas primárias e secundárias empregando, como fonte de energia nas reações, o aquecimento em refluxo e em microondas. Está demonstrado no esquema abaixo os onze β -aminoálcoois formados e suas condições reacionais.



Esquema 7: Condições: *i*) óxido de limoneno, H₂O/ ácido de Lewis, amina (0,6- 5 eq), 100°C, 12-24h; *ii*) óxido de limoneno, H₂O / alumina, amina (1eq), 10 min, 450w.

3.1 Alterações reacionais desenvolvidas

3.1.1 Métodos reacionais

Nas reações em refluxo, os protocolos utilizados incluem água destilada e ácido de Lewis como catalisadores, já nas reações com o uso de microondas foram utilizadas água destilada e alumina neutra. Optou-se por efetuar a síntese também

em forno de microondas, pois a aminólise é uma reação que exige tempo prolongado, excesso de amina e altas temperaturas.

3.1.2 Aminas utilizadas

Nessas reações foram utilizadas várias aminas primárias e secundárias, sendo elas alifáticas (monoaminas e diaminas), aromáticas ou cíclicas (monoaminas e diaminas) para observar a reatividade de cada uma delas frente ao epóxido. Ainda foram efetuados protocolos com estequiometrias variadas entre 0,6 a 5 eq visando o melhor rendimento com seletividade máxima. Observam-se os protocolos **2a** e **4b** da tabela 2.1 que a etanolamina gerou nas mesmas condições que a propilamina, produtos enantiomericamente impuros, necessitando de alterações em dois fatores reacionais: redução do tempo e quantidade de reagente.

3.1.3 Tempo reacional

O tempo reacional foi um fator muito importante nesse trabalho e tendo em mente que o objetivo era obter apenas o aminoálcool *trans*, ele foi cuidadosamente determinado, sendo 24 horas o período reacional máximo realizado. No caso do protocolo **6b** e **6d** (tabela 2.1), apenas o aumento do tempo foi o fator limitante levando a formação de produto indesejado.

3.1.4 Catalisadores

Foram utilizados dois catalisadores para cada metodologia e observado experimentalmente que a presença e a quantidade do mesmo no meio foi de extrema importância para o desenvolvimento da síntese. Ficou claro nos protocolos **3a** e **3b**, **5a** e **5b**, (tabela 2.1) que mantendo as condições e alterando apenas a quantidade do catalisador o resultado apresentou uma enorme diferença no rendimento. Isso implicou na escolha e quantidade do catalisador já que apresentou uma função importante para um bom desfecho reacional.

3.1.5 Padrão interno

Nessas reações foi utilizado padrão interno para quantificar a conversão dos reagentes ao produto. O padrão interno escolhido foi a trietilamina, visto que não influenciaria na reação, nem na leitura dos cromatogramas (CG). No método otimizado da cromatografia, o pico da mesma aparece em cerca de 2,8 minutos. Enquanto que os tempos de retenção (t.r.) das aminas estão acima de 6 minutos, do óxido de limoneno 2 em torno de 13 minutos e os t.r. dos produtos após 18 minutos.

Para comprovar que o padrão interno não influencia na análise do trabalho, efetuaram-se reações comparativas 4b e 4c da tabela 1 e a diferença condisse com o erro experimental.

3.2 Sínteses em refluxo

3.2.1 Água destilada como catalisador

Como se pode observar na tabela abaixo, poucas aminas se mostraram seletivas frente ao máximo de rendimento. Para isso, optou-se por reduzi-lo obtendo apenas um isômero. As análises da seletividade foram efetuadas e Cromatografia Gasosa (CG).

Tabela 2.1: Estudo reacional em refluxo com água destilada como catalisador.

Protocolo N°	Condições	Conversão (%)	Seletividade (%)		Rdt CG-FID (%)	Rdt obtido (%)
			Trans	Cis		
1^a	24h (PutNH ₂ /1eq, H ₂ O/3eq Et ₃ N/1 eq)	90,8	68,9	31,1	62,5	-
1b	18h (PutNH ₂ /0,6eq, H ₂ O/3eq Et ₃ N/1 eq)	63,8	91,8	8,2	58,6	-
1c	12h (PutNH ₂ /0,6eq, H ₂ O/3eq Et ₃ N/1 eq)	32,8	100	0	32,8	28
2^a	24h (EtanolNH ₂ /1 eq, H ₂ O/3eq)	84,1	81,5	18,5	68,5	-
2b	18h (EtanolNH ₂ /1 eq, H ₂ O/3eq)	68,8	93,2	6,8	64,1	-
2c	18h (EtanolNH ₂ /0,6 eq, H ₂ O/3eq)	36,6	100	0	36,6	32,1
3^a	18h (morfNH ₂ /1eq, H ₂ O/1eq, Et ₃ N/1 eq)	0	100	0	0	-
3b	18h (morfNH ₂ /1eq, H ₂ O/3eq, Et ₃ N/1 eq)	25	91,4	8,6	22,8	-
3c	24h (morfNH ₂ /1eq, H ₂ O /3eq, Et ₃ N/1 eq)	56,9	89,2	0,8	50,7	-
3d	18h (morfNH ₂ /2eq, H ₂ O/3eq, Et ₃ N/1 eq)	33	95,2	4,8	31,4	29,8
4^a	18h (PropNH ₂ /1 eq, H ₂ O/1 eq, Et ₃ N/1 eq)	15	100	0	15	-
4b	24h (PropNH ₂ /1 eq, H ₂ O/3eq, Et ₃ N/1 eq)	48	100	0	48	48

4c	24h (PropNH ₂ /1 eq, H ₂ O/3eq)	45,2	100	0	45,2	-
5^a	18h (FurfNH ₂ /1 eq, H ₂ O/1 eq, Et ₃ N/1 eq)	3	100	0	3	-
5b	18h (FurfNH ₂ /1 eq, H ₂ O/3 eq, Et ₃ N/1 eq)	35	100	0	35	-
5c	24h (FurfNH ₂ /1 eq, H ₂ O/3 eq, Et ₃ N/1 eq)	42	100	0	42	34
5d	15h (FurfNH ₂ /2 eq, H ₂ O/3 eq, Et ₃ N/1 eq)	42,5	87	13	37	-
5e	18h (FurfNH ₂ /2 eq, H ₂ O/3 eq, Et ₃ N/1 eq)	62	85,7	14,3	53,1	-
6^a	18h (IsoBuNH ₂ /1 eq, H ₂ O/1 eq, Et ₃ N/1 eq)	19	100	0	19	-
6b	18h (IsoBuNH ₂ /1 eq, H ₂ O/3 eq, Et ₃ N/1 eq)	30	100	0	30	23
6c	20h (IsoBuNH ₂ /1 eq, H ₂ O/3 eq, Et ₃ N/1 eq)	32	96,2	3,8	32	-
6d	24h (IsoBuNH ₂ /1 eq, H ₂ O/3 eq, Et ₃ N/1 eq)	40,2	85,7	14,3	34,5	-
6e	18h (IsoBuNH ₂ /2 eq, H ₂ O/3 eq, Et ₃ N/1 eq)	63,3	88,3	11,7	55,9	-
7^a	24h (tolNH ₂ /1 eq, H ₂ O/3eq, Et ₃ N/1 eq)	23,2	100	0	23,2	-
7b	18h (tolNH ₂ /2 eq, H ₂ O/3eq, Et ₃ N/1 eq)	48	100	0	48	37
8^a	18h (BnNH ₂ /1 eq, H ₂ O/1 eq, Et ₃ N/1 eq)	15	100	0	15	-
8b	18h (BnNH ₂ /1 eq, H ₂ O/3 eq, Et ₃ N/1 eq)	16	100	0	16,0	-
8c	24h (BnNH ₂ /1 eq, H ₂ O/3 eq, Et ₃ N/1 eq)	20,7	100	0	20,7	13,8
8d	18h (BnNH ₂ /2 eq, H ₂ O/3 eq, Et ₃ N/1 eq)	40	92,8	7,2	37,1	-
9^a	24h (anilNH ₂ /1 eq, H ₂ O/3eq, Et ₃ N/1 eq)	7	100	0	7	3,1
9b	24h (anilNH ₂ /2 eq, H ₂ O/3eq, Et ₃ N/1 eq)	48	94	6	45,1	-
10^a	18h (piperNH ₂ /2 eq, H ₂ O/3eq, Et ₃ N/1 eq)	50	97	3	48,5	41
10b	24h (piperNH ₂ /1 eq, H ₂ O/3eq, Et ₃ N/1 eq)	4,8	100	0	4,8	-
11^a	18h (NH ₄ OH/2 eq, H ₂ O/3eq, Et ₃ N/1 eq)	9,2	100	0	9,2	4,5
11b	24h (NH ₄ OH /2 eq, H ₂ O/3eq, Et ₃ N/1 eq)	15,7	100	0	15,7	-

Focando apenas num protocolo comum (1Eq de amina e 3 Eq de água destilada) da tabela 2.1 discute-se os seguintes resultados:

Na aminólise geradora do **27a** e **27b** houve necessidade de reduzir a quantidade de amina e do tempo (**1c** e **2c**) para que não ocorresse mistura enantiomérica e no caso da primeira também a formação de dímeros.

De acordo com a análise do CG reacional, o aminoálcool **27c** (com morfNH₂), não foi obtido como um produto puro, ocorrendo sempre formação da mistura enantiomérica. A formação do aminoálcool **27d** (protocolo 4) foi enantioespecífica em todos os protocolos, não necessitando de grande excesso de amina para atingir o máximo de rendimento. Esse protocolo também foi ideal para a síntese de **27e** e **27h** apresentando seletividade e bons rendimentos, 42 e 20,7% respectivamente (**5c** e **8c**). Para a aminólise do **27f** a abertura do aminoálcool *cis* ocorreu mais

facilmente, obrigando à redução do rendimento total (30%) para manter apenas o aminoálcool do epóxido *trans* (**6b**) como produto.

O aminoálcool **27g** é formado com ótimo rendimento, 48% (7b). A toINH₂ possui substituinte ativador do anel aromático, levando ao aumento do caráter nucleofílico da mesma. Isso é observado se compararmos com a anilina que não apresentou nenhum elemento ativador no anel aromático.

Foi observado que a formação do aminoálcool **27i** foi mais lenta quando comparada com as demais aminas. Trata-se de um resultado esperado, pois se sabe que anilina é considerada menos básica do que as alquilaminas típicas.

Com relação à formação do aminoálcool **27j**, a reação ocorreu fornecendo ótimo rendimento, mas com mistura enantiomérica (**10a**) e baixo rendimento quando a quantidade de amina foi reduzida (**10b**) esse procedimento evitou igualmente a formação de dímeros. Por fim, o aminoálcool **27l**, foi formado com rendimento baixo (15,7%) mesmo em condições forçadas (2Eq de amina, 3Eq de H₂O por 24h).

3.2.1.1 Estudo cinético

No estudo cinético (figura 2.7) de uma reação com grande excesso de amina, observou-se com acompanhamento em CG a formação do aminoálcool formado pelo óxido de limoneno *trans* ainda na primeira hora e, depois de cerca de 15 horas se estabilizou. Porém, a reação de formação do aminoálcool gerado do óxido *cis* iniciou com 6 horas aumentando até 31 horas de reação e após estabilizando.

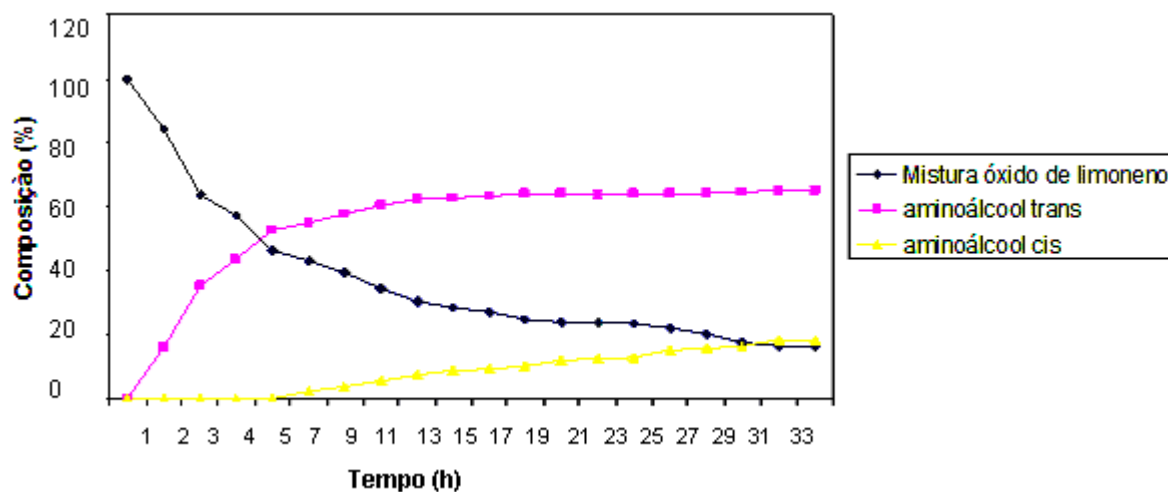


Figura 2.7: Cinética reacional com grande excesso de amina

Para reafirmar esse comportamento foi desenvolvida uma avaliação com apenas o óxido de limoneno *cis*, e a reação também estabilizou, restando óxido de limoneno ao final de 36 horas, conforme demonstra a figura 2.8.

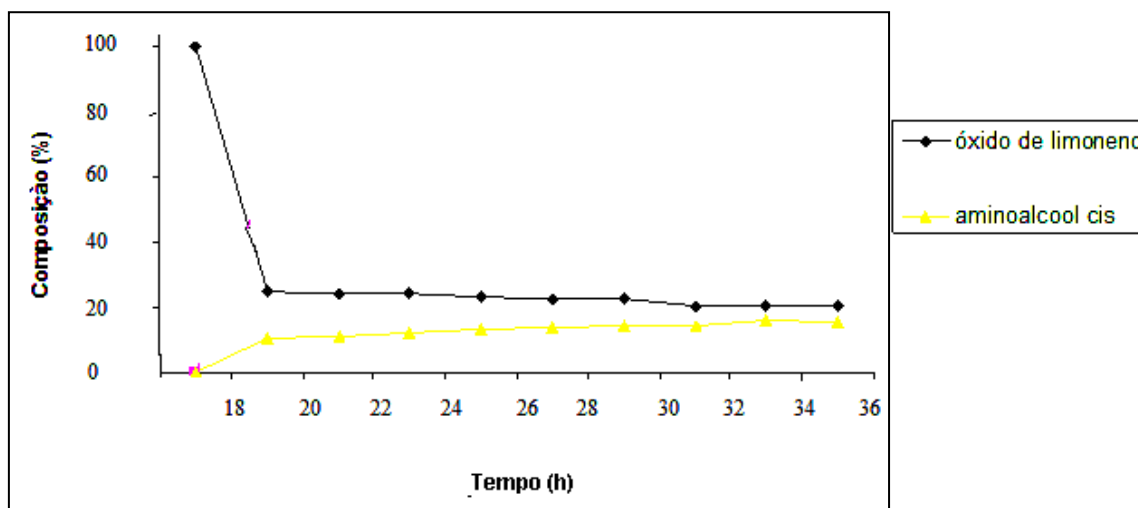


Figura 2.8: Aminólise com óxido de limoneno *cis*.

3.2.2.2 Formação de diol

Para ter certeza de que não houve formação de diol nas reações acima, formou-se o mesmo através de uma reação rápida (1h),⁴⁵ com a mistura *cis* + *trans* do óxido de limoneno e ácido sulfúrico 1%. Através do cromatograma do diol (figura 2.9) observou-se os picos em cerca de 16 minutos dos dióis *cis* e *trans* formados. Comparando-se os cromatogramas da reação de aminólise com morfolina e formação do diol há ausência do t.r. em cerca de 16 minutos no protocolo utilizado (figura 2.10) implicando que não há formação de diol em nenhum momento. Como observado nos CGs abaixo:

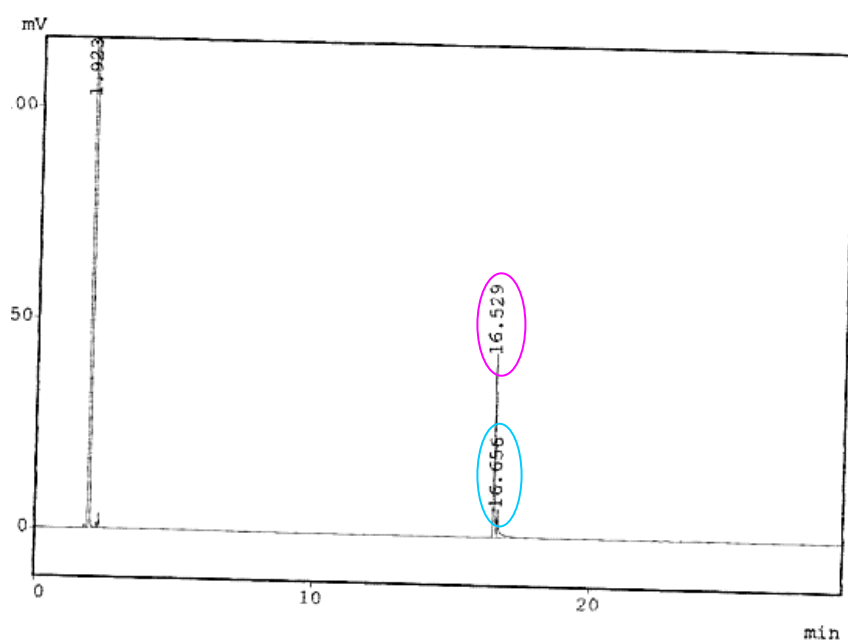


Figura 2.9: Análise em CG da reação do diol com a mistura *cis* e *trans*.

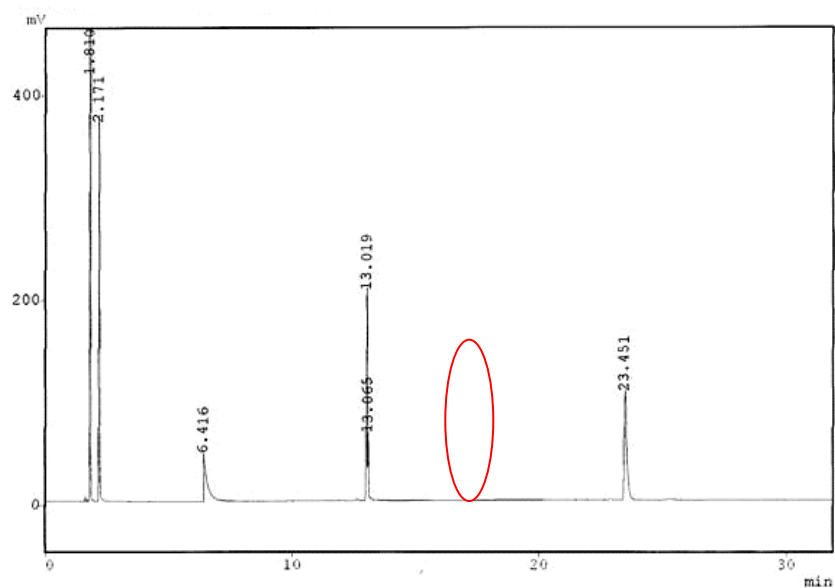


Figura 2.10: Avaliação em CG da reação em refluxo com morfolina e água destilada.

3.2.2 Ácido de Lewis como catalisador

Acredita-se que os Ácidos de Lewis (AL) catalisam a abertura de anel epóxido atacando o carbono menos impedido do anel, C-2, gerando inicialmente compostos *trans* e em seguida o carbono mais impedido formando compostos *cis* mais rapidamente que quando comparado às reações com água destilada (figura 2.11).

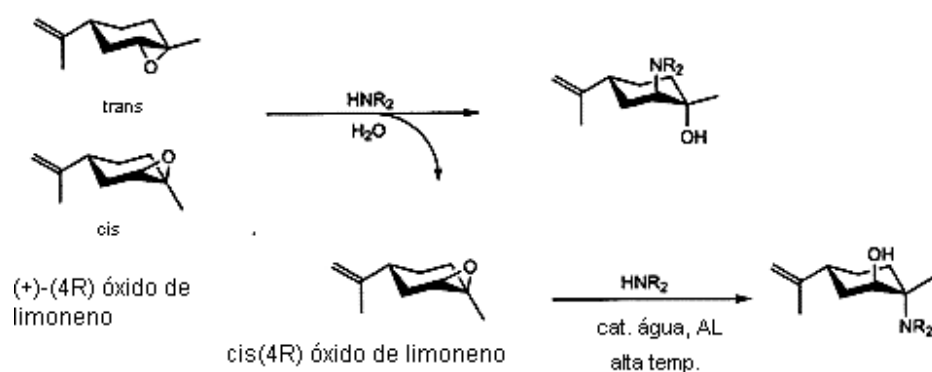
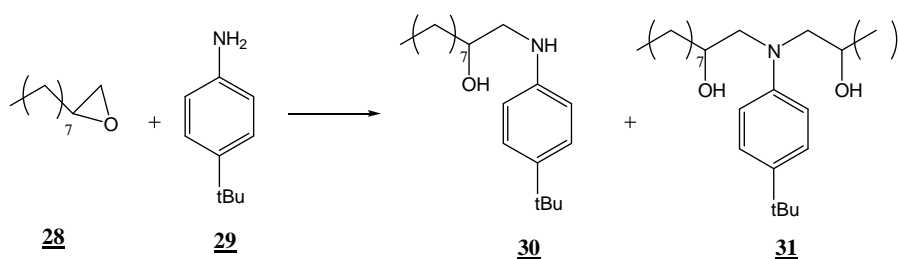


Figura 2.11: Abertura do epóxido *cis* e *trans* com AL como catalisador.

Entre os resultados encontrados na literatura com a abertura de diversos epóxidos está a utilização de $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ que forneceu ótimos rendimentos (85-94%) a temperatura ambiente, e em menores tempos reacionais (1-5h).³⁹ Os autores também demonstram que os triflatos em geral são os melhores AL para a abertura de epóxido com aminas, uma vez que são ácidos fracos. A utilização de AL fortes leva à complexação com as aminas utilizadas, obtendo-se baixos rendimentos.³⁹

A utilização de CoCl_2 apresenta certo grau de complexação com as aminas, mas ainda assim forneceu um bom rendimento em temperatura ambiente.⁴⁰ Já a utilização de BiCl_3 requer alta temperatura e longo tempo reacional produzindo cloridrinas, dependendo do solvente utilizado.⁴¹ Em relação aos solventes, foi demonstrado que os mais apolares como ciclohexano e diclorometano são mais eficientes. A utilização de acetonitrila e solventes mais polares facilitam a produção de cloridrinas⁴¹ e produtos de bis-alquilação, quando se utilizam aminas primárias.⁴² A proporção de catalisador relatada na literatura varia de 5 a 20 mol%, não sendo necessário maiores quantidades.^{39,41}

.....Na figura abaixo, reagindo óxido de decenila **28** com uma anilina primária, *p*-*tert*-butilanilina **29** em diclorometano e várias quantidades de catalisador em 12 horas à temperatura ambiente observa-se formação do aminoálcool **30** e o produto bis-alquilado **31**. A melhor conversão e seletividade ocorreram quando se usou 1 Eq de InBr_3 (conv: 92% e 100% de seletividade para **30**).



Esquema 8: i) InBr_3 , CH_2Cl_2 , temp. ambiente, 12h.

.....Pretendeu-se assim, desenvolver uma tabela comparativa entre os protocolos novos e os já utilizados, visando o método mais simples e eficiente para a construção de uma grande variedade de β -aminoálcoois para detectar novos *hits* de

maneira seletiva com outros catalisadores. Investigando a abertura do anel epóxido do óxido **2** utilizou-se AL como catalisadores. Os catalisadores testados foram: $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, ZnCl_2 , e AlCl_3 . Os resultados são apresentados na Tabela 2. As reações foram otimizadas com a benzilamina, sendo escolhido o que apresentou melhor rendimento para as demais aminas.

O ZnCl_2 não foi um bom catalisador visto que pode ter ocorrido uma possível complexação com a benzilamina impossibilitando a abertura do epóxido (**12b**). Nota-se uma enorme diferença entre o rendimento obtido (0,8%) e os rendimentos das outras reações. O $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ foi o que forneceu o melhor rendimento bruto (48,5%) com a benzilamina (**12d**), sendo o catalisador escolhido para ser efetuado com outras aminas. Com as demais aminas o $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ também foi um bom catalisador chegando a gerar 66,5% de produtos com a propilamina (**13**) e o menor rendimento foi obtido com a anilina (**17**). Ressalta-se que a seletividade das reações não foi determinada e se espera mistura enantiomérica entre os isômeros com o uso desses catalisadores.

Tabela 2.2: Reações em refluxo com diversos AL como catalisadores.

Protocolo N°	R (amina)	Catalisador	Tempo (h)	Produto	Rdt. (%)*
12 ^a	BnNH ₂	$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	24	27h	20,2
12b	BnNH ₂	ZnCl_2	24	27h	0,8
12c	BnNH ₂	AlCl_3	24	27h	35,5
12d	BnNH ₂	$\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$	24	27h	48,5
13	PropNH ₂	$\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$	24	27d	66,5
14	FurfNH ₂	$\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$	24	27e	51,8
15	MorfNH ₂	$\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$	24	27c	45,2
16	IsobutNH ₂	$\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$	24	27f	39,8
17	AnilNH ₂	$\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$	24	27i	38,4

* mistura *cis/trans* não determinada.

3.3 Reações em microondas

Muitos trabalhos foram desenvolvidos com o uso de irradiações de MO. A sua junção com a Síntese Orgânica é bastante promissora, apresentando bons rendimentos em tempos reacionais menores assim, acelerado ainda mais o processo de descoberta de novos fármacos.⁴³ Na Química, muitas reações são

realizadas até 1240 vezes mais rápidas quando conduzidas sob a ação das MO.⁴⁵ Frente a isso, optou-se por desenvolver as aminólises igualmente sob a irradiação com microondas a fim de realizar uma comparação com os resultados obtidos em solução.

3.3.1 Com água destilada como catalisador

Com esse catalisador foram efetuadas diversas reações modificando a quantidade de amina de 1 a 5 Eq. Avaliando os resultados pode-se afirmar que em todos os casos, com o aumento da quantidade de amina a abertura do epóxido foi facilitada (tabela 2.3). Nesses protocolos não foi determinado a seletividade entre os isômeros *cis* e *trans* podendo ter misturas enantioméricas entre os produtos.

Os rendimentos foram mais baixos do que as reações em refluxo tendo uma variação de 15 a 25%. Ressalta-se ainda que a purificação dos produtos foi efetuada com cromatografia em coluna (CC) possibilitando maior perda de produto do que no caso do uso de forno de bolas, metodologia utilizada nas reações em refluxo.

Tabela 2.3: Avaliação reacional efetuada em MO.

Protocolo N°	R (amina)	Condições	Tempo (min)	Produto	Rdt. (%)*
18 ^a	PutNH ₂	Amina/2Eq, H ₂ O/1 eq,	10	<u>27a</u>	15,3
18b	PutNH ₂	Amina/5 eq, H ₂ O/1 eq,	10	<u>27a</u>	23
19 ^a	EtanolNH ₂	Amina/2Eq, H ₂ O/1 eq,	10	<u>27b</u>	20,1
19b	EtanolNH ₂	Amina/5 eq, H ₂ O/1 eq,	10	<u>27b</u>	25,6
20 ^a	MorfNH ₂	Amina/2Eq, H ₂ O/1 eq,	10	<u>27c</u>	17,2
20b	MorfNH ₂	Amina/5 eq, H ₂ O/1 eq,	10	<u>27c</u>	23
21 ^a	PropNH ₂	Amina/2Eq, H ₂ O/1 eq,	10	<u>27d</u>	11
21b	PropNH ₂	Amina/5 eq, H ₂ O/1 eq,	10	<u>27d</u>	19
22 ^a	FurfNH ₂	Amina/2Eq, H ₂ O/1 eq,	10	<u>27e</u>	9
22b	FurfNH ₂	Amina/5 eq, H ₂ O/1 eq,	10	<u>27e</u>	12
23 ^a	IsoBuNH ₂	Amina/2Eq, H ₂ O/1 eq,	10	<u>27f</u>	13
23b	IsoBuNH ₂	Amina/5 eq, H ₂ O/1 eq,	10	<u>27f</u>	18,9
24 ^a	ToiNH ₂	Amina/2Eq, H ₂ O/1 eq,	10	<u>27g</u>	16,4
24b	ToiNH ₂	Amina/5 eq, H ₂ O/1 eq,	10	<u>27g</u>	20,1
25 ^a	BnNH ₂	Amina/2Eq, H ₂ O/1 eq,	10	<u>27h</u>	18,6

25b	BnNH₂	Amina/5 eq, H ₂ O/1 eq,	10	<u>27h</u>	24
26^a	AnilNH₂	Amina/2Eq, H ₂ O/1 eq,	10	<u>27i</u>	11,2
26b	AnilNH₂	Amina/5 eq, H ₂ O/1 eq,	10	<u>27i</u>	15
27^a	PiperNH₂	Amina/2Eq, H ₂ O/1 eq,	10	<u>27j</u>	13,9
27b	PiperNH₂	Amina/5 eq, H ₂ O/1 eq,	10	<u>27j</u>	19,2
28^a	NH₄OH	Amina/2Eq, H ₂ O/1 eq,	10	<u>27l</u>	2,8
28b	NH₄OH	Amina/5 eq, H ₂ O/1 eq,	10	<u>27l</u>	5

* mistura *cis/trans* não determinada e purificação efetuada em CC.

3.3.2 Alumina neutra como catalisador

Foi utilizada a alumina neutra para catalisar a reação visto que a alumina ácida poderia facilitar a abertura do epóxido *cis*. Nessas quantidades de amina não foi efetuada avaliação enantiomérica dos produtos podendo ter mistura. Os rendimentos foram inferiores das reações com água destilada, implicando que a mesma é mais efetiva nos dois métodos (refluxo e irradiação de MO). Na tabela 2.4 observamos os resultados onde os rendimentos variaram entre 1,3 a 20% e com largo excesso de amina houve um aumento significativo.

Tabela 2.4: Estudo reacional com alumina como catalisador.

Protocolo N°	R (amina)	Condições	Tempo (min)	Produto	rdt. (%)*
29^a	PutNH₂	Amina/2Eq, alumina/1 eq,	10	<u>27a</u>	7,8
29b	PutNH₂	Amina/5 eq, alumina/1 eq,	10	<u>27a</u>	11
30^a	EtanoINH₂	Amina/2Eq, alumina/1 eq,	10	<u>27b</u>	8,6
30b	EtanoINH₂	Amina/5 eq, alumina/1 eq,	10	<u>27b</u>	12,3
31^a	MorfNH₂	Amina/2Eq, alumina/1 eq,	10	<u>27c</u>	8,5
31b	MorfNH₂	Amina/5 eq, alumina/1 eq,	10	<u>27c</u>	13
32^a	PropNH₂	Amina/2Eq, alumina/1 eq,	10	<u>27d</u>	6,3
32b	PropNH₂	Amina/5 eq, alumina/1 eq,	10	<u>27d</u>	9
33^a	FurfNH₂	Amina/2Eq, alumina/1 eq,	10	<u>27e</u>	3,6
33b	FurfNH₂	Amina/5 eq, alumina/1 eq,	10	<u>27e</u>	5
34^a	IsoBuNH₂	Amina/2Eq, alumina/1 eq,	10	<u>27f</u>	6,8
35b	IsoBuNH₂	Amina/5 eq, alumina/1 eq,	10	<u>27f</u>	9
36^a	ToINH₂	Amina/2Eq, alumina/1 eq,	10	<u>27g</u>	8,5
36b	ToINH₂	Amina/5 eq, alumina/1 eq,	10	<u>27g</u>	11,5
37^a	BnNH₂	Amina/2Eq, alumina/1 eq,	10	<u>27h</u>	11,6
37b	BnNH₂	Amina/5 eq, alumina/1 eq,	10	<u>27h</u>	20
38	AnilNH₂	Amina/2Eq, alumina/1 eq,	10	<u>27i</u>	5,2
38b	AnilNH₂	Amina/5 eq, alumina/1 eq,	10	<u>27i</u>	9
39^a	PiperNH₂	Amina/2Eq, alumina/1 eq,	10	<u>27j</u>	4,9
39b	PiperNH₂	Amina/5 eq, alumina/1 eq,	10	<u>27j</u>	10
40^a	NH₄OH	Amina/2Eq, alumina/1 eq,	10	<u>27l</u>	1,3
40b	NH₄OH	Amina/5 eq, alumina/1 eq,	10	<u>27l</u>	2

* mistura *cis/trans* não determinada. E purificação efetuada em CC.

3.3.3 Avaliação da enantiosseletividade reacional

Foi efetuada também a avaliação da seletividade reacional com os dois catalisadores e 1Eq de amina. No gráfico abaixo, encontram-se os resultados com tempo de 10 minutos e os rendimentos obtidos nesse experimento com excesso de água e leve excesso de amina (mesmas condições utilizadas para discussão em refluxo) foram calculados baseando-se nas análises do CG.

Observou-se que as reações com BnNH_2 e PuNH_2 apresentaram ótimas conversões, porém houve abertura do epóxido *cis*. Com as aminas, PropNH_2 , IsoBuNH_2 e FurfNH_2 os rendimentos foram muito bons e não houve formação do aminoálcool *cis*. Por fim, novamente a água destilada demonstrou ser o melhor agente catalisador para a formação seletiva de β -aminoálcoois derivados do limoneno.

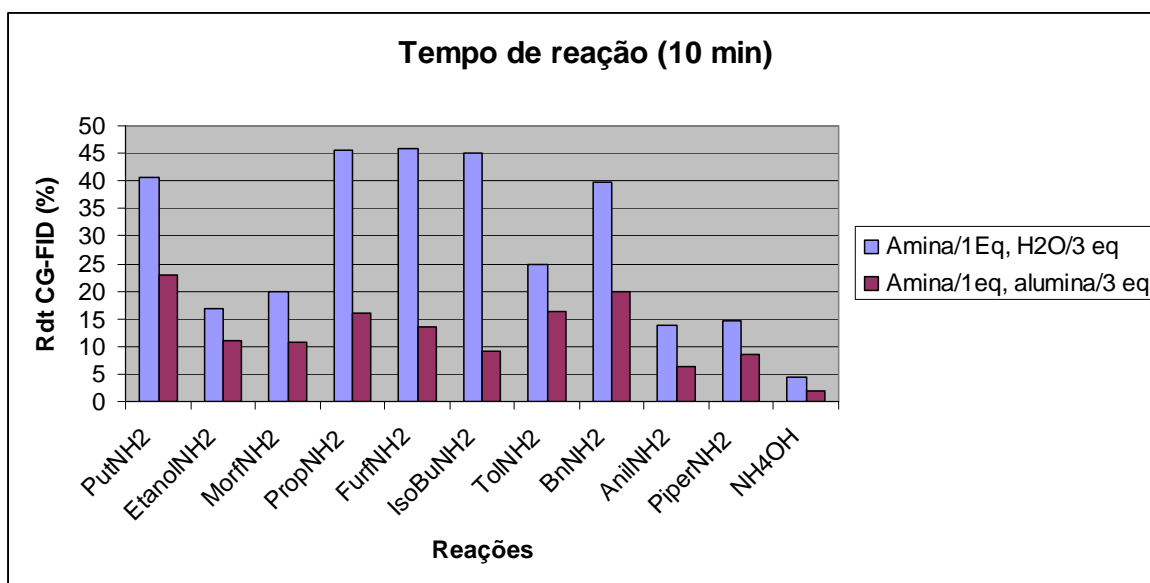


Figura 2.12: Avaliação da seletividade das reações efetuadas em MO.

3.4 Purificação

A etapa de purificação foi a que mais limitou o trabalho, devido a utilização de excesso de amina para que a reação ocorresse em no máximo 24h. Esse excesso trouxe problemas, já que a polaridade se assemelhava com o produto formado. Foram desenvolvidas várias metodologias para o isolamento do produto, como: extração, formação de enaminona, cloridrato, cromatografia em coluna e por fim, destilação fracionada. Para melhor compreensão elas serão discutidas abaixo.

3.4.1 Extrações líquido-líquido

As técnicas de extração usadas mostraram-se ineficazes na purificação dos compostos. Tanto na extração ácido-base quanto na extração simples não ocorreu completa separação entre reagentes e o produto. Junto com o aminoálcool permanecia parte de amina. Além disso, houve muita perda de produto durante esse processo. Para contornar este problema foi proposta a formação de enaminonas, que será abordada no item a seguir.

3.4.2 Formação de enaminona

Em função de não ter conseguido a total purificação do produto pelo método anterior, partiu-se para a formação de enaminona do tipo **28**, gerada a partir do excesso de amina utilizado, numa reação tipo *scavenger* (Figura 2.13). Adicionou-se acetoacetato de etila e TSOH solubilizado em tolueno seco no bruto reacional e, por adição nucleofílica, age como um *scavenger* com a amina primária em excesso (por 1 hora), formando a enamina **28** ou com aminas secundárias para formar a iminona **29**.

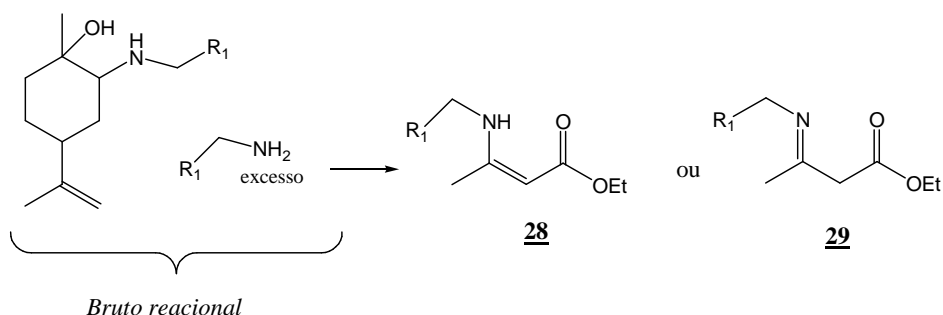


Figura 2.13: Reação de formação de enaminonas ou iminonas para retirada do excesso de amina do meio reacional.

Com a formação da imina ou enamina poder-se-ia obter produtos de baixa polaridade a partir de compostos de alta polaridade, e desta maneira a purificação por cromatografia seria facilitada. No entanto, houve muita perda de produto já que mesmo depois dessa etapa necessitou-se utilizar CC ou formação de cloridrato para finalizar o processo de purificação.

3.4.3 Formação de cloridrato

Após várias tentativas, passou-se à formação de cloridrato. O HCl gasoso em contato com o bruto reacional forçou a precipitação das aminas presentes no meio. Assim, tendo apenas o produto aminado a formação seletiva do sal seria a forma de evitar a utilização de CC. O objetivo foi concretizado e o sal formado, porém o rendimento máximo foi de 5%, extremamente baixo. Acredita-se que existam vários fatores que influenciaram nesse resultado, como fluxo variável do ácido, polaridade do solvente em que o bruto está solúvel, entre outros.

3.4.4 Cromatografia em Coluna – CC

O excesso de amina gerou dificuldades na separação cromatográfica, devido a sua polaridade próxima ao do aminoálcool e uma possível interação durante o desenvolvimento da técnica. Mesmo com diversas modificações (tamanho da coluna, quantidade e tipos de eluentes, quantidade de amostra, entre outros). Esse foi um método muito empregado no trabalho, que com seus problemas possibilitou

purificar os produtos (com grandes perdas) e dar continuidade ao trabalho de análises biológicas. Embora tenha tido mais perda do que com a destilação fracionada, obtendo rendimento máximo de 26%, a pureza se manteve entre 88% e 95%.

Na figura 2.14, pode-se observar o acompanhamento da CC de uma reação. Primeiramente foi separado o óxido de limoneno que não reagiu (fração A). Em seguida, observa-se a purificação da porção do aminoálcool formado (fração B) e na fração C, nota-se a mistura entre parte do aminoálcool e o excesso de amina implicando na dificuldade da purificação. O eluente utilizado nessa CC foi hexano: acetato de etila na proporção 1:1.

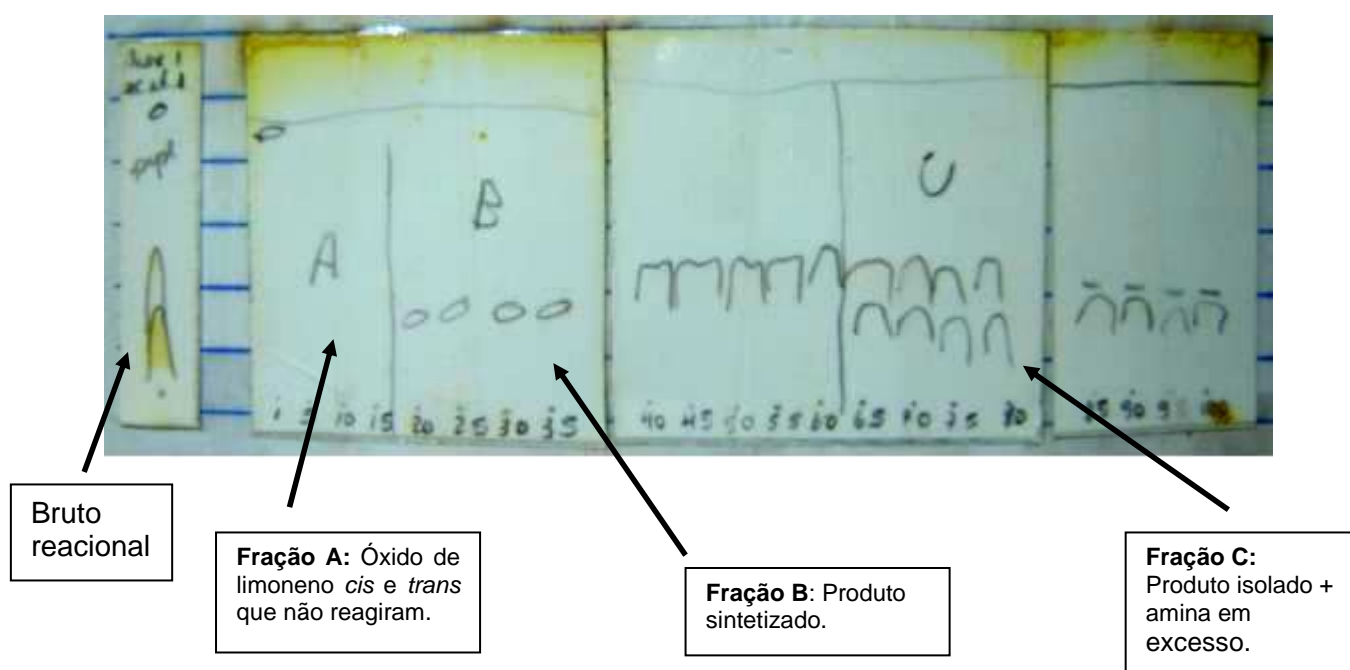


Figura 2.14: CCD do bruto reacional e da reação

3.4.5 Destilação Fracionada em forno de bolas

A última tentativa foi empregada com sucesso: a purificação por destilação fracionada realizada em um forno de bolas Büchi, acoplado a uma bomba de alto vácuo. Durante a destilação as válvulas mantiveram-se abertas sendo necessário vácuo dinâmico para a retirada total dos reagentes. A perda do produto foi mínima

durante esse processo e foi realizado para todos os compostos sintetizados fornecendo produtos com pureza entre 95-100% e rendimentos isolados de até 43,2% com produto enantioseletivo. Visto que o máximo de rendimento é de 50% para cada isômero.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais

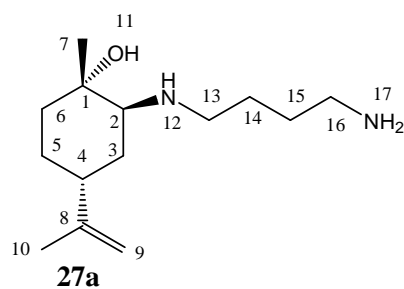
O óxido *R*-(+)-limoneno (Sigma) foi utilizado após interação com alumina ativada para retirada de peróxidos. As aminas, quando necessário, foram destiladas para manter a pureza e mantidas sob KOH. Em relação aos gases, o argônio (White Martins, 99,999%), foi passado por 3 *traps* contendo catalisador BASF R3-11, KOH e peneira molecular de 3Å ativada. O monóxido de carbono (AGA, 99,5%) e o hidrogênio (White Martins, 99,999%) foram utilizados sem nenhum tratamento prévio.

4.2 Preparação dos produtos

4.2.1 Procedimento geral para a aminólise do óxido *R*-(+)-limoneno em refluxo

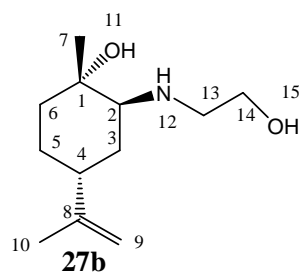
Em uma ampola de vidro, foram adicionados 1mL, 6,10mmols de óxido de *R*-(+)-limoneno, 0,3 mL (3eq) de água destilada, amina e 1mL, 7,12mmols do padrão interno, trietilamina. A mistura foi imersa em banho de óleo entre 18 a 24 horas à 100°C, sob intensa agitação. O aminoálcool foi separado do óxido através da utilização de vários métodos, a mais efetiva foi a destilação em forno de bolas. Os produtos foram analisados com CG, ¹H RMN e ¹³C RMN (ver em anexo os espectros dos produtos **27d** e **27h**). As seções abaixo descrevem pormenores da técnica para cada amina.

2-(putrescino)-4-isopropenil-1-metilcicloexanol



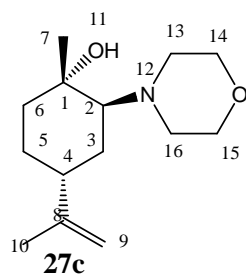
Amina utilizada: putrescina 0,6 eq (0,36mL, 4,65mmols). Tempo de aminólise: 12 horas. A purificação foi feita por destilação fracionada. Rendimento (CG_FID): 32,8%. Rendimento isolado: 28%. $[\alpha]_D^{20} = +23$ (c=1,14 Etanol). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): 2,1 (m, 1H_2); 1,95* (m, 2H_3); 2,15 (m, 1H_4); 1,47* (m, $4\text{H}_{5,6}$); 4,7 (s, 1H_{9a}); 4,8 (s, 1H_{9b}); 1,2 (s, 3H_7); 1,7 (s, 3H_{10}); 2,69* (m, 2H_{13}); 1,50 (m, 4H_{14}); 2,47 (m, H_{15}); 2,69* (m, H_{16}); $^{13}\text{C-RMN}$ δ 21,5 ($\text{C}_{7,10}$); 25,9 (C_{14}); 27,6 (C_5); 30,1 (C_{15}); 31,0 (C_6); 34,6 (C_3); 37,9 (C_4); 41,7 (C_{16}); 47,8 (C_{13}); 61,7 (C_2); 71,9 (C_1); 109,3 (C_9); 148,4 (C_8).

2-(etanolamino)-4-isopropenil-1-metilcicloexanol



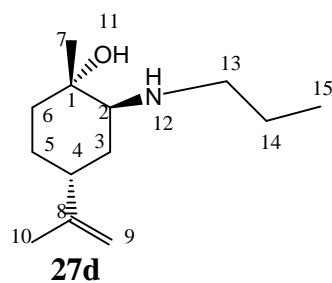
Amina utilizada: etanolamina 0,6 eq (0,25mL, 4,14mmols). Tempo de aminólise: 18 horas. A purificação foi feita por destilação fracionada. Rendimento (CG_FID): 36,6%. Rendimento isolado: 31,2%. $[\alpha]_D^{20} = +25$ (c=1,14 Etanol). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): 2.59 (m, 1H_2); 1,8 (m 2H_3); 2.1 (m, 1H_4); 1.58 (m, $4\text{H}_{5,6}$); 4.7 (s, 1H_{9a}); 4.8 (s, 1H_{9b}); 1.2 (s, 3H_7); 1.7 (s, 3H_{10}); 2.85 (m, 2H_{13}); 2.66 (m, 2H_{14}). $^{13}\text{C-RMN}$ δ 21.5 ($\text{C}_{7,10}$); 25.9 (C_5); 30.2 (C_6); 34.7 (C_3); 37.9 (C_4); 49.3 (C_{13}); 60.9 (C_{14}); 61.4 (C_2); 72.0 (C_1); 109.5 (C_9); 148.3(C_8).

2-(morfolino)-4-isopropenil-1-metilcicloexanol



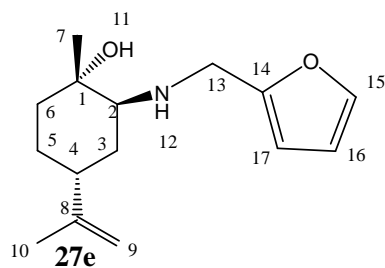
Amina utilizada: morfolina 2 eq (1,06mL, 12,25mmols). Tempo de aminólise: 18 horas. A purificação foi feita por destilação fracionada. Rendimento (CG_FID): 33%, Rendimento isolado: 29,8%. $[\alpha]_D^{20} = +37$ (c=1, Etanol), $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): 2,4 (m, 1H₂); 2,0* (m, 2H₃); 1,95 (m 1H₄); 1,48* (m, 4H_{5,6}), 4,7 (s, 1H₉), 4,8 (s, 1H₉), 1,7 (s, 3H₁₀), 1,1 (s, 3H₇), 3,6 (m, 4H_{13, 16}), 2,4 (m, 4H_{14,15}); $^{13}\text{C-RMN}$ δ 22,1 (C₇); 22,3 (C₁₀); 24,4 (C₅); 24,8 (C₆); 35,5 (C₃); 38,8 (C₄); 51,9 (C_{12, 15}); 67,3 (C₂); 67,4 (C_{13, 14}); 72,6 (C₁); 110,9 (C₉); 145,3 (C₈).

2-(propilamino)-4-isopropenil-1-metilcicloexanol



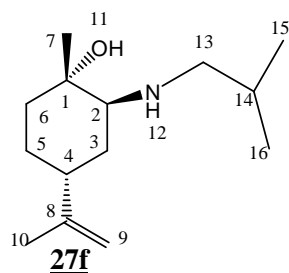
Amina utilizada: propilamina 1 eq (0,84mL, 10,21mmols). Tempo de aminólise: 24 horas. A purificação foi feita por destilação fracionada. Rendimento (CG_FID): 48%, Rendimento obtido: 43,2%. $[\alpha]_D^{20} = +40$ (c=1.1, Etanol). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): δ 2,5 (m, 1H₂), 1,98* (m, 2H₃), 2,45 (m, 1H₄), 1,5* (m, 4H_{5,6}), 1,2 (s, 3H₇), 4,8 (s, 2H₉), 1,7 (s, 3H₁₀), 2,6* (m, 4H₁₃), 0,9 (t, $J=7,4$ Hz, 3H₁₅); $^{13}\text{C-RMN}$ δ 11,7 (C₇ and C₁₀), 21,5 (C₁₅); 23,4 (C₁₄), 25,5 (C₅), 34,4 (C₃ and C₆), 37,9 (C₄), 50,0 (C₁₃); 61,7 (C₂), 71,9 (C₁), 109,2 (C₉), 148,4 (C₈).

2-(furfurilamino)-4-isopropenil-1-metilcicloexanol



Amina utilizada: furfurilamina 1 eq (0,61ml, 6,59mmols). Tempo de aminólise: 24 horas. A purificação foi feita por destilação fracionada. Rendimento (CG_FID): 42%, Rendimento obtido: 34%. **PF do cloridrato:** 141-143°C. $[\alpha]_D^{20} = + 54$ (c=1,14 Etanol). **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3): 2.6 (m, 1H₂); 1.85 (m, 2H₃); 2.2 (m, 1H₄); 1.58 (m, 4H_{5,6}); 4.7 (s, 1H_{9a}); 4.8 (s, 1H_{9b}); 1.2 3H₇; 1.7 (s, 3H₁₀); 1.94 (m, 2 H₁₃); 6.29 (1H₁₇); 6.16 (1H₁₆); 7.35 (s, 1H₁₅). **$^{13}\text{C-RMN}$** δ 21,4 (C_{7,10}); 154.0 (C₁₄); 26 (C₅); 106.8 (C₁₅); 30.1 (C₆); 34,4 (C₃); 37,8 (C₄); 110.0 (C_{16,17}); 44.6 (C₁₃); 60.8 (C₂); 71,9 (C₁); 109,2 (C₉); 148,6 (C₈).

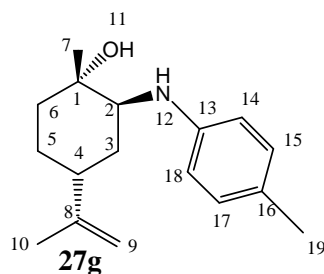
2-(isobutilamino)-4-isopropenil-1-metilcicloexanol



Amina utilizada: isobutilamina 1 eq (0,61ml, 9,90mmols). Tempo de aminólise: 18 horas. A purificação foi feita por destilação fracionada. Rendimento (CG_FID): 30%, Rendimento obtido: 23%. **PF do cloridrato:** 243°C. $[\alpha]_D^{20} = + 42$ (c=1.1, Etanol). **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3): 2,57 (dd J= 7,0 Hz e11,4Hz, 1H₂); 1,9* (m 2H₃); 2,49 (m, 1H₄); 1,55* (m, 4H_{5,6}), 4,7 (s, 1H_{9a}); 4,8 (s, 1H_{9b}); 1,7 (s, 3H₁₀); 1,2 (s, 3H₇); 2,27 (d, J= 6,5Hz H_{13b}); 2,30 (d, J=6,5 H_{13a}); 1,63 (m, 1H₁₄); 0,45* (d, J= 6,60, 3H₁₆); 0,65* (d, J=6,60, 3H₁₅). **$^{13}\text{C-RMN}$** δ 20,5 (C_{15, 16}); 20,6 (C₁₇); 21,5 (C_{7, 10}); 25,9 (C₅); 30,2 (C₆);

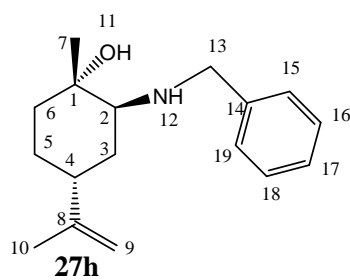
34,4 (C₃); 37,9 (C₄); 56,1 (C₁₃); 56,2 (C₁₄); 61,9 (C₂); 72,1 (C₁); 109,3 (C₉); 148,5 (C₈).

2-(toluidino)-4-isopropenil-1-metilcicloexanol



Amina utilizada: toluidina 2eq (1,31mg, 12,22mmols). Tempo de aminólise: 18 horas. A purificação foi feita por destilação fracionada. Rendimento (CG_FID): 48%, Rendimento obtido: 37%. $[\alpha]_D^{20} = +26$ (c=1,14 Etanol). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl₃): 3.48 (m, 1H₂); 2.0 (m, 2H₃); 2.14 (m, 1H₄); 1.68 (m, 4H_{5,6}); 4.7 (s, 2H₉); 1.3 (s, 3H₇); 1.8 (s, 3H₁₀); 6.96 (d J=7.9Hz, 2H_{14,18}); 6.57 (d J=6.60, 2H_{15,17}); 2.19 (s, 3H₁₉). $^{13}\text{C-RMN}$ δ 20.3 (C_{7,10}); 21.3 (C₁₉); 25.9 (C₅); 31.1 (C₆); 34.5 (C₃); 38.3 (C₄); 57.6 (C₂); 71.9 (C₁); 113.6 (C₁₄); 126.6 (C₁₆); 129.8 (C₁₅); 145.3 (C₈); 148.5 (C₁₃).

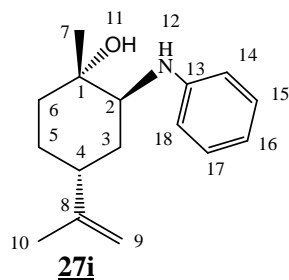
2-(benzilamino)-4-isopropenil-1-metilcicloexanol



Amina utilizada: benzilamina 1 eq (0,50mL, 4,58mmols). Tempo de aminólise: 24 horas. A purificação foi feita por destilação fracionada. Rendimento (CG_FID): 20,7%, Rendimento obtido: 13,8%. $[\alpha]_D^{20} = +53$ (c=1, Etanol). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl₃): 2,5 (m, 1H₂); 1,86* (m, 2H₃); 2,15 (m, 1H₄); 1,58 (m, H_{5,6}); 1,1 (s, 3H₇); 1,7 (s, 3H₁₀); 4,8 (s, 2H₉); 3,85 (d, 1H_{13a}); 3,67 (d, 1H_{13b}); 7,27 (s, 5H₁₄₋₁₉). $^{13}\text{C-RMN}$ δ 21,4 (C_{7,10});

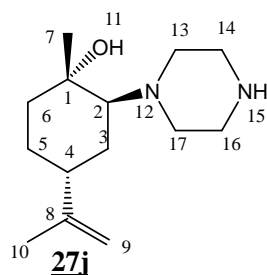
26,1 (C₅); 30,0 (C₆); 34,4 (C₃); 37,9 (C₄); 52,1 (C₁₃); 61,2 (C₂); 72,0 (C₁); 109.3 (C₉); 126.9 (C₁₇); 128.1 (C_{15,19}); 128.5 (C_{16,18}), 140,7 (C₁₄); 148.7 (C₈).

2-(anilino)-4-isopropenil-1-metilcicloexanol



Amina utilizada: anilina 1 eq (0,5mL, 6,02mmols). Tempo de aminólise: 24 horas. A purificação foi feita por destilação fracionada. Rendimento (CG_FID): 7%, Rendimento obtido: 3,1%. **PF do cloridrato:** 172°C. $[\alpha]_D^{20} = + 52$ (c=1,14 Etanol). **¹H-RMN** (CDCl₃): 3.49 (m, 1H₂); 1.93 (m, 2H₃); 2.1 (m H₄); 1.62 (m, H₅); 4.7 (s, 2H₉); 1.2 (s 3H₇); 1.7 (s, 3H₁₀); 6.9 (m, 2 H_{14,16,18}); 7.1 (m, 2 H_{15,17}); **¹³C-RMN** δ 21.3 (C_{7,10}); 26.1 (C₅); 31.3 (C₆); 34.4 (C₃); 38.9 (C₄); 57.6 (C₂); 72.4 (C₁); 110.0 (C₉); 112.6 (C_{14,18}); 147.6 (C₈); 148.8 (C₁₃); 116.9 (C₁₆); 118.8 (C_{15,17}).

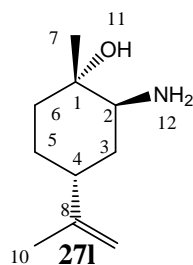
2-(piperazino)-4-isopropenil-1-metilcicloexanol



Amina utilizada: piperazina 2 eq (0,5mg, 4,3mmols). Tempo de aminólise: 18 horas. A purificação foi feita por destilação fracionada. Rendimento (CG_FID): 50%, Rendimento obtido: 41%, $[\alpha]_D^{20} = + 18$ (c=1, Etanol). **¹H-RMN** (CDCl₃): 2,57 (m, 1H₂); 1,95* (m, 2H₃); 2,3 (m, 1H₄); 1,50* (m, 4H_{5,6}); 4.8 (s, 1H_{9a}); 4.9 (s 1H_{9b}); 1.1 (s, 3H₇); 1.7 (s, 3H₁₀); 2.42* (m, 4H_{13,17}); 2.85* (4m, H_{14,16}). **¹³C-RMN** δ 22.1 (C₇); 22.3

(C₁₀); 24.5 (C₅); 24.9 (C₆); 35,6 (C₃); 38,8 (C₄); 45.7 (C_{14,16}); 50.7 (C_{13,17}); 67.5 (C₂); 72.2 (C₁); 111.0 (C₉); 145.3 (C₈).

2-(amino)-4-isopropenil-1-metilcicloexanol



Amina utilizada: hidróxido de amônio 2 eq (0,8mL, 5,69mmols). Tempo de aminólise: 18 horas. A purificação foi feita por destilação fracionada. Rendimento (CG_FID): 9,2%, Rendimento obtido: 4,5%. $[\alpha]_D^{20} = + 29$ (c=1,14 Etanol). **¹H-RMN** (CDCl₃): 2.6 (s, 1H₂); 1.69 (m, 2H₃); 2.0 (m, 1H₄); 1.29 (m, 4 H_{5,6}); 4.5 (s, 2 H₉); 0.9 (s, 3 H₇); 1.5 (s, 3 H₁₀). **¹³C-RMN** δ 21.2 (C_{7,10}); 26.1 (C₅); 33.7 (C₆); 34.1 (C₃); 37.5 (C₄); 55.3 (C₂); 71.8 (C₁); 109.1 (C₉); 148.7 (C₈)

4.2.2 Preparação do diol

Com uma reação clássica, segundo Wolinski. Foi utilizado 32,5 mg de óxido de limoneno em um balão de 250 mL com banho de gelo. Depois de resfriado adicionou-se 145 mL de ácido sulfúrico 1%. A reação durou 1 hora e a purificação foi feita com extração simples com acetato de etila.

5 CONCLUSÕES

O óxido de limoneno se mostrou um ótimo material de partida para a geração de β -aminoálcoois. Foram sintetizados onze compostos através de uma síntese conhecida, sob vários protocolos e modificação das condições reacionais. A maior dificuldade nesse trabalho foi a purificação, uma etapa importante na Química Medicinal já que necessita-se do produto puro para posteriores ensaios biológicos. Foram diversas as tentativas que levaram à melhor metodologia.

As reações foram efetuadas em solução, sob refluxo e com o uso de MO. Em refluxo, ocorreram de forma promissora com bons a ótimos rendimentos, com todos os catalisadores utilizados. Nesses protocolos foi efetuado o estudo de seletividade reacional, implicando que a quantidade de amina e catalisadores influenciam diretamente no rendimento reacional.

As reações sob irradiação de microondas apresentaram rendimentos finais um pouco menores em relação à metodologia descrita acima, porém, com metodologia de purificação diferente. O maior diferencial é o tempo de reação, passando a formação dos β -aminoálcoois de horas para minutos.

6 REFERÊNCIAS

6 REFERÊNCIAS

1. SHERRY CHOW, H.H.; SALAZAR, D.; HAKIM, I. A. Pharmacokinetics of perillidic acid in humans after a single dose administration of a citrus preparation rich in d-limonene content 1. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 11, p. 1472-1476, 2002.
2. a) BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. Common Fragrance and Flavor Materials. **Preparation, Properties and Uses**, 4th ed. Wiley-VCH, Weinheim, p.293, 2001. b) DUARTE, M.O. Propriedades farmacológicas do limoneno e de seus derivados. **Trabalho de Conclusão de Curso**, Faculdade de Farmácia/UFRGS, 2004.
3. STANCIULESCU, M.; IKURA, M. Limonene ethers from tire pyrolysis oil. Part 1: Batch experiments. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 75, p. 217-225, 2006.
4. LIMBERGER, J. Carbonilação catalítica de alilaminoálcoois: síntese de hidróxi-gama-lactamas e oxazolidinas bicíclicas. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
5. ONAKA, M.; KAWAI, M.; IZUMI, Y. Zeolite-catalyzed ring-opening of epoxides with amines. **Chemistry Letters**, p. 779-782, 1985.
6. GRAEBIN, C. S.; LIMBERGER, J.; ROSA, R. G. da; EIFLER-LIMA, V. L. Solid-phase synthesis of limonene derivatives. In: **The 2nd Brazilian Symposium in Medicinal Chemistry**, Livro de Resumos. Rio de Janeiro: Instituto Militar da Engenharia, 2004.
7. GUSEVSKAYA, E; ROCHA, L.L. da; DIAS, A. de O.; SANTOS, E.N. dos; AUGUSTINI, R. Palladium/tin catalyzed alkoxy-carbonylation of naturally occurring bicyclic monoterpenes. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemica**, v. 132, p. 213-221, 1998.
8. GRAEBIN, C. S.; EIFLER-LIMA, V. L.; ROSA, R. G. One-pot synthesis of secondary and tertiary amines from R(+)-limonene by tandem hydroformylation/reductive amination (hydroaminomethylation). **Catalysis Communications**, v. 9, p. 1066-1070, 2008.
9. CANTO, R.F.S. Síntese em fase sólida de derivados diaminaados do limoneno com potencial atividade biológica **Trabalho de Conclusão de Curso**, Faculdade de Farmácia/UFRGS, 2007.
10. LEE E. E YOON, C. H.; *8-Endo* Cyclization of (Alkoxy-carbonyl)methyl Radicals: Stereoselective Synthesis of (-)-Clavukerin A and (-)-11-Hydroxyguaiene. **Tetrahedron Letters**, v. 37, p. 5929-5930, 1996.

22. KURESHY, R. I.; SINGH, S.; KHAN, N. H.; ABDI, S. H. R.; SURESH, E.; JASRA, R.V. Efficient method for ring opening of epoxides with amines by NaY zeolite under solvent-free conditions. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 264, p. 162–169, 2007.
23. a) CHINI, M.; CROTTI, P.; FAVERO, L.; MACCHIA, F.; PINESCHI, M. Lanthanide (III) trifluoromethanesulfonates as extraordinarily effective new catalysts for the aminolysis of 1,2-epoxides. **Tetrahedron Letters**, v. 35, p. 433-436, 1994. b) SEKAR, G.; SINGH, V.K. **Journal of Organic Chemistry**, v. 64, p. 287-289, 1999. c) CEPANEC, I., LITVIC, M.; MIKULDAS, H.; BARTOLINCIC, A.; VINKOVIC, V. **Tetrahedron**, v. 59, p. 2435-2439, 2003.
24. KOTSUKI, H.; HAYASHIDA, K.; SHIMANOUCI, T.; NISHIZAWA, H. High-Pressure Organic Chemistry. High-Pressure-Promoted, Silica Gel-Catalyzed Reaction of Epoxides with Nitrogen Heterocycles. **Journal of Organic Chemistry**, v. 61, p 984-990, 1996.
25. AZIZI, N.; SAIDI, M.R. Highly efficient ring opening reactions of epoxides with deactivated aromatic amines catalyzed by heteropoly acids in water. **Tetrahedron**, v. 63, p. 888-891, 2007.
26. HANSON, R. M. the synthetic methodology of nonracemic glycidol and related 2,3-epoxy alcohols. **Chemical Reviews**, v. 91, p. 437-475, 1991.
27. CHAKRABORTI, A. K., KONDASKAR, A., RUDRAWAR, S., Scope and limitations of montmorillonite K 10 catalysed opening of epoxide rings by amines. **Tetrahedron**, v. 60, p. 9085–9091, 2004.
28. POSNER, G.H.; ROGERS, D. Z. Organic Reactions at Alumina Surfaces. Mild and Selective Opening of Epoxides by Alcohols, Thiols, Benzeneselenol, Amines, and Acetic Acid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99 p. 8208- 8214, 1977.
29. YAMAMOTO, Y.; ASAO, N.; MEGURO, M.; TSUKADA, N.; NEMOTO, H.; SADAYORI, N.; WILSON, J.G.; NAKAMURA, H. Regio- and Stereo-selective Ring Opening of Epoxides with Amide Cuprate Reagents. **Journal of the Chemical Society-Chemistry Communications**, v. 15, p 1201-1203, 1993.
30. SAGAWA, S.; ABE, H.; HASE, Y.; INABA, T. Catalytic Asymmetric Aminolysis of 3,5,8-Trioxabicyclo[5.1.0]octane Providing an Optically Pure 2-Amino-1,3,4-butanetriol equivalent. **Journal of Organic Chemistry**, v. 64, p. 4962-4965, 1999.
31. CHINI, M.; CROTTI, P.; MACCHIA, F. Metal salts as new catalysts for mild and efficient aminolysis of oxiranes. **Tetrahedron Letters**, v. 31, p. 4661-4664, 1990.
32. MOJTAHEDI, M. M.; SAIDI, M. R.; BOLOURTCHIAN, M. Microwave-assisted Aminolysis of Epoxides Under Solvent-free Conditions Catalyzed by Montmorillonite Clay. **Journal of Chemical Research**, p. 128-129, (S) 1999.

33. HAMADA, H.; KONDO, Y.; ISHIHARA, K.; NAKAJIMA, N.; HAMADA, H.; KURIHARA, R.; HIRATA, T. Stereoselective Biotransformation of Limonene and Limonene Oxide by Cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC 7942. **Journal of Bioscience and bioengineering**, v.96, p.581-584, 2003.
34. VAN DER WERF, M.J.; ORRUK, R. V.A.; OVERKAMP K.M.; SWARTS, H.J.; OSPRIAN, I.; STEINREIBER, A.; BONT, J.A.M DE; FABER, K. Substrate specificity and stereospecificity of limonene-1,2-epoxide hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14; an enzyme showing sequential and enantioconvergent substrate conversion. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p.380-385, 1999.
35. CHATTERJEE, T.; BHATTACHARYYA, D. K.; Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.55, p. 541-546, 2001.
36. SPEELMANS, G.; BIJLSMA, A.; EGGINK, G.; Limonene bioconversion to high concentrations of a single and stable product, perillic acid, by a solvent-resistant *Pseudomonas putida* strain. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 50, p. 538-544, 1998.
37. BERGER, R. G. *Aroma Biotechnology*, Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 1995.
38. STEINER, D.; SETHOFER, S. G.; GORALSKI, C. T.; SINGARAM, B. Asymmetric addition of diethylzinc to aldehydes catalyzed by β -amino alcohols derived from limonene oxide. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 13, p. 1477, 2002.
39. PLACZEK, A. T.; DONELSON, J. L.; TRIVEDI, R.; GIBBS, R. A.; DE, S. K. Scandium triflate as an efficient and useful catalyst for the synthesis of β -amino alcohols by regioselective ring opening of epoxides with amines under solvent-free conditions. **Tetrahedron Letters**, v. 46, p. 9029, 2005.
40. SUNDARARAJAN, G.; VIJAYAKRISHNA, K.; VARGHESE, B. Synthesis of β -amino alcohols by regioselective ring opening of arylepoxides with anilines catalyzed by cobalt chloride. **Tetrahedron Letters**, v. 45, p. 8253, 2004.
41. McCLUSKEY, A.; LEITCH, S. K.; GARNER, J.; CADEN, C. E.; HILL, T. A.; ODELL, L. R.; STEWART, S. G. BiCl_3 -mediated opening of epoxides, a facile route to chlorohydrins or amino alcohols: one reagent, two paths. **Tetrahedron Letters**, v. 46, p. 8229, 2005.
42. RODRIGUEZ, J. R.; NAVARRO, A. Opening of epoxides with aromatic amines promoted by indium tribromide: a mild and efficient method for the synthesis of β -amino alcohols. **Tetrahedron Letters**. v. 45, p. 7495, 2004.
43. GRAEBIN, C. S.; EIFLER-LIMA, V. L. O Uso do Forno de Microondas na Síntese Orgânica em Fase Sólida. **Química Nova**, v. 28, p. 73, 2005.

44. DALL'OGGIO, E.L. Reações de hexacloroacetona com nucleófilos nitrogenados, oxigenados, e de enxofre: efeitos de ultra-som e microondas. **Tese de doutorado** em Química Orgânica. Centro de Ciências Físicas e Matemáticas-programa de Pós-graduação em Química- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p.176, 2002.

45. a) WOLINSKY, J.; BARKER, W. **Journal of the American Chemical Society**, v. 82, p.82, 1960. b) WOLINSKY, J.; SLABAUGH, M.R.; GIBSON, T. **Journal of Organic Chemistry**, v.29, p. 3740, 1964.

CAPÍTULO III. ENSAIOS BIOLÓGICOS

1 INTRODUÇÃO - Atividade Antifúngica

1 INTRODUÇÃO- Atividade Antifúngica

Os fungos são microorganismos ubíquos e encontram-se em vegetais, no homem, em detritos, na água e em abundância no solo. A habilidade dos fungos em causar doenças em seres humanos parece ser um fenômeno acidental diagnosticado como doença oportunista e estaria associada ao estado imunitário do indivíduo e sua exposição ambiental¹.

Os fungos constituem a base de uma quantidade de processos industriais de fermentação, tais como a elaboração do pão, vinho, cerveja, preparação de certos queijos entre outros. São empregados na produção de muitos ácidos orgânicos e de algumas preparações vitamínicas, e são responsáveis pela manufatura de certos fármacos antibióticos entre os quais destaca-se a penicilina.

A alta incidência das doenças provocadas por fungos no Brasil, conseqüente de questões como o uso inadequado de antimicrobianos e a grande quantidade de procedimentos invasivos realizados nos hospitais, indicaram a necessidade de mudanças na terapêutica das infecções fúngicas, a fim de que novos fármacos proporcionem aos pacientes maior segurança e eficácia do que as existentes até então. Atualmente com a grande população de pacientes imunodeprimidos, as infecções fúngicas hospitalares estão cada vez mais freqüentes sendo essencial à realização de estudos científicos.

Alguns dos fármacos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas (sistêmicas e superficiais) são anfotericina B, azóis, flucitosina (pró-fármaco), tiocarbamatos, terbinafina e griseofulvina. Vive-se uma época onde a terapêutica das infecções fúngicas está sendo totalmente modificada com o lançamento de vários fármacos com perfil de segurança e eficácia superior à anfotericina B. Da mesma forma, novos diagnósticos estão disponíveis e todos estes recursos só poderão ser utilizados com eficácia se forem de domínio dos diferentes profissionais de saúde que assistem pacientes de risco para tais infecções.

A pesquisa de extratos de plantas e produtos naturais para atividade antimicrobiana tem demonstrado que plantas representam uma fonte potencial de novos agentes antifecciosos. A terapia tradicional está se encaminhando para uma crise devido ao rápido desenvolvimento de resistência aos agentes existentes, o que aumenta consideravelmente a procura por novas e eficazes substâncias com atividade antimicrobiana.² Os óleos essenciais de plantas contendo limoneno, são capazes de inibir o crescimento de bactérias e fungos.^{3,4,5} Visto os testes serem feitos com vários compostos existentes nos óleos essenciais testados não se pode descartar a possibilidade de atividade sinérgica.

Estudos efetuados com terpenos isolados demonstraram apresentar atividade antimicrobiana relevante⁶. Visto isso, almejou-se avaliar se os derivados do limoneno apresentavam atividade antifúngica relevante frente a várias cepas.

2 OBJETIVO

Visto os óleos essenciais e alguns terpenos apresentarem interessante atividade antifúngica, optou-se por avaliar se o limoneno e alguns derivados sintetizados também apresentariam atividades relevantes para alguns importantes fungos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os produtos testados (figura 3.1) partiram do limoneno **1** e os detalhes da síntese está no capítulo anterior desse trabalho.

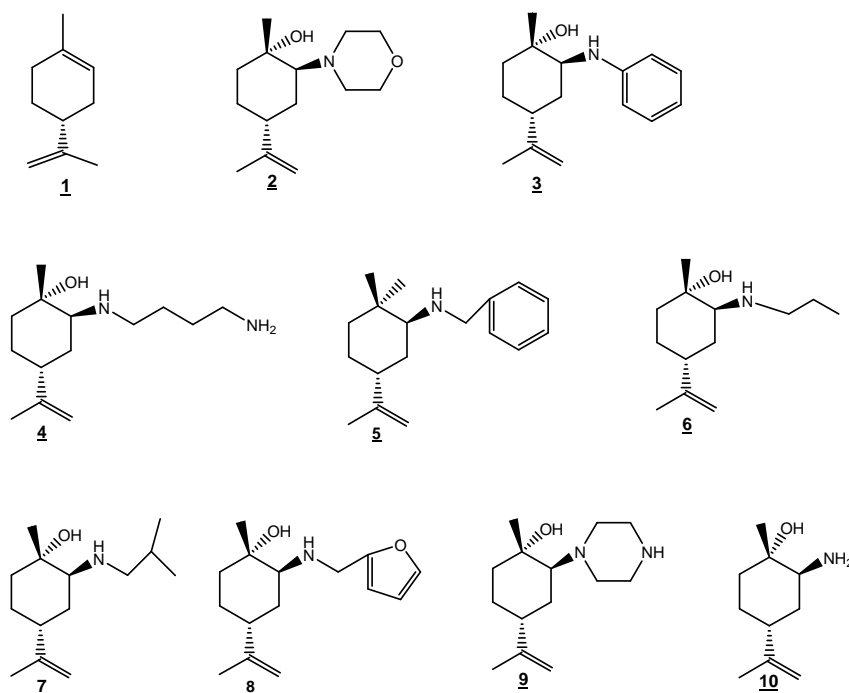


Figura 3.1: Produtos testados para ação antifúngica

Os produtos foram submetidos a nove cepas diferentes, conforme tabela 3.4. Observa-se que nenhum dos compostos apresentou atividade antifúngica significativa e o composto **5** possibilitou o melhor resultado nessa avaliação, demonstrando ser mais ativo em três cepas: *Microsporum gypseum* C 115, Tr: *Trichophyton rubrum* C113, Tm: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972, mesmo assim a atividade foi baixa comparando-as com os padrões utilizados. Além disso, o **4**, **6** e **7** apresentaram discreta atividade para esses mesmos microorganismos em relação aos padrões. Comparando-se isso ao limoneno **1** nota-se que as modificações estruturais foram uma boa estratégia, podendo ser refinadas para posteriores testes.

Tabela 3.1: Atividade antifúngica encontrada frente a importantes fungos.

*CIM/CFM (µg/mL) dos compostos padrões	Fungos								
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763	<i>C. neoformans</i> ATCC 32264	<i>A. flavus</i> ATCC 9170	<i>A. fumigatus</i> ATCC 26934	<i>A. niger</i> ATCC 9029	<i>M. gypseum</i> C115	<i>T. rubrum</i> C113	<i>T. mentagrophytes</i> ATCC 9972
1	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
2	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
3	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
4	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	250/> 250	250/> 250	250/> 250
5	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	125/> 250	125/> 250	125/> 250
6	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	250/> 250	250/> 250	250/> 250
7	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	250> 250	250> 250	250> 250
8	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
9	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
10	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
AmB***	0.78	0.50	0.25	0.50	0.50	0.50	0.125	0.075	0.075
Ctcz***	1.56	3.12	0.39	0.78	0.78	1.56	0.04	0.01	0.025
Tbnf***	0.5	0.5	0.25	0.125	0.50	0.25	0.05	0.025	0.025

*CIM/CFM (µg/mL) Concentração Inibitória Mínima e Concentração fungicida mínima (µg/mL).

**A presença de apenas um valor, sem a "/" indica que os valores da CIM e da CFM são semelhantes.

***AmB = Anfotericina B; Ctcz = Cetoconazol; Tbnf = Terbinafina

4 PARTE EXPERIMENTAL

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Preparação das amostras

As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido com concentração de 100 vezes a concentração final obtida nos poços, as quais foram diluídas 1:10 e em seguida, 1:5 em meio RPMI. Posteriormente foi adicionado 100µL da diluição 1:5 no primeiro poço das placas e realizada uma diluição seriada.

4.2 Microorganismos e meios.

Para a avaliação da atividade antifúngica dos produtos acima, foram utilizadas cepas da American Type Culture Collection Rockville, MD, EUA (ATCC) e do CEREMIC (C), Centro de referência Micológica, Faculdade de ciências Bioquímicas e farmacêuticas, Rosário, Argentina: Ca: *Candida albicans* ATCC 10231, Sc: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, Cn: *Cryptococcus neoformans* ATCC 32264, An: *Aspergillus niger* ATCC 9029, Afu: *Aspergillus fumigatus* ATCC 26934, Afl: *Aspergillus flavus* ATCC 9170, Mg: *Microsporium gypseum* C 115, Tr: *Trichophyton rubrum* C113, Tm: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972. Os microrganismos cresceram em ágar inclinado sabouraud-cloranfenicol por 48 horas a 30°C.

4.3 Testes de susceptibilidade antifúngica

A concentração inibitória mínima (CIM) para cada produto isolado foi determinada usando a técnica de microdiluição do caldo em microplacas de 96 poços como descrito pelo Comitê Nacional para Padrões de Laboratórios Clínicos para leveduras (M27-A2)⁷ e para fungos filamentosos (M 38 A,⁷). Os valores de CIMs foram determinados em meio de cultura apropriado- RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, EUA), tamponado (pH=7,0) com MOPS (ácido morfopropileno sulfônico). A inoculação inicial foi de aproximadamente 1×10^3 a 5×10^3 UFC/ml (UFC= unidades formadoras de colônias). As placas foram mantidas em câmara escura por 35°C

para o desenvolvimento de leveduras e hialofitomicetos, e a 28-30°C para dermatófitos. A CIM foi definida como a concentração inibitória mínima da amostra a qual resultou na total inibição do crescimento dos fungos, após um período de 48h de incubação. A suscetibilidade dos fármacos utilizados como padrões cetoconazol, terbinafina e anfotericina B foi definida como a concentração mais baixa do fármaco a qual resulta na total inibição do crescimento do fungo.

Para os ensaios, as amostras dos produtos isolados foram solubilizadas em DMSO (concentração final de 1%) e submetidas a uma série de duas diluições com RPMI 1640, obtendo-se concentrações entre 800- 0,98µg/mL, com volume final de 100µL. este volume foi adicionado a cada halo, com exceção do controle, onde a água esterilizada foi adicionada ao poço. A CIM foi definida como a concentração inibitória mínima do produto que resultou em total inibição do crescimento do fungo.

Para a realização da avaliação antifúngica com os ensaios de microdiluição em caldo, as concentrações dos produtos até 100µg/mL foram incorporados aos meios de crescimento seguindo as diretrizes do NCCLS.^{7,8} A concentração inibitória mínima considerada ativa para os produtos foi CIM ≤ 200 µg/mL.

5 CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

Os compostos testados apresentaram baixa atividade antifúngica frente às cepas testadas. Dentre as moléculas, quatro apresentaram ações em três cepas sendo os melhores resultados obtidos nesse estudo. O limoneno **1** não apresentou atividade, demonstrando que as modificações estruturais são importantes para melhorar a ação, não podendo descartar a possibilidade de outras alterações moleculares e testes posteriores, visto ter relatos na literatura de óleos essenciais que apresentam essa função.

6 REFERÊNCIAS

1. WANKE, B.; LAZÉRA, M.S.; NUCCI, M., Fungal infections in the immunocompromised host. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.95, p.153-158, 2000.
2. SCHER, J.M.; SPEAKMAN, J.B.; ZAPP, J.; BECKER, H. Bioactivity guided isolation of antifungal compounds from the liverwort *Bazzania trilobata* (L.) S. F. Gray. **Phytochemistry**. v. 65, p. 2583-2588, 2004.
3. a) DEANS, S.G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 5, p. 165-180, 1987. b) KIM, J.; MARSHALL, M.R.; WEI, C.I. Antibacterial activity of some essential oils components against five foodborne pathogens. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v. 43, p. 2839-2845, 1995. c) ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P.; CATÃO, R.M.R.; LIMA, E.O.; SOUZA, D.P.; NUNES, X.P.; PEREIRA, M.S.V.; BARBOSA-FILHO, J.M.; CUNHA, E.V.L. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, p 307-313, 2006.
4. CACCIONI, D. R. L.; GUIZZARDI, M.; BIONDI, D. M.; RENDA, A.; RUBERTO, G. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 73-79, 1998.
5. ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P.; CATÃO, R.M.R.; LIMA, E.O.; SOUZA, D.P.; NUNES, X.P.; PEREIRA, M.S.V.; BARBOSA-FILHO, J.M.; da CUNHA, E.V.L. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Jornal Brasileiro de Farmacognosia**, v16, p 307-313, 2006.
6. KIM, J.; MARSHALL, M. R.; WEI, C. I. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 43, p. 2839-2845, 1995.
7. NCCLS, **National Committee of clinical laboratory standards**. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 2nd edition, Wayne, Pa, v.22, n.15, p. 1-29, 2002.
8. NCCLS, **National Committee of clinical laboratory standards**. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard, 2nd edition, Wayne, Pa, v.22, n.16, p. 1-27, 2002.

1 INTRODUÇÃO –Atividade Carrapaticida

1INTRODUÇÃO- Atividade Carrapaticida

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1887) é uma das espécies mais amplamente distribuídas do carrapato e constitui um grande problema para a indústria de gado nas regiões tropicais e subtropicais do mundo.

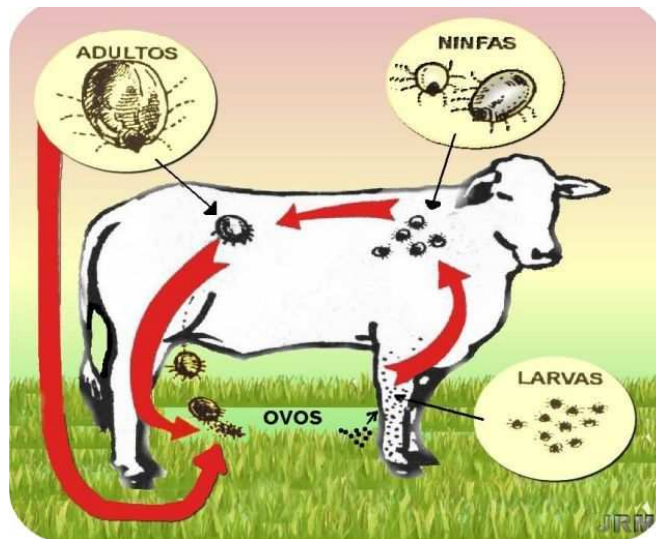
Um parasita de grande impacto econômico, responsável por prejuízos anuais estimados em mais de US\$ 2 bilhões na criação de gado em geral no Brasil e mais de US\$ 13 bilhões no mundo. Os prejuízos econômicos manifestam-se por perdas na produção de carne, leite e derivados, indústria coureiro-calçadista^{1,2}, custo com profissionais para controlá-los, com manejo, instalações apropriadas e danos ambientais pelo elevado uso de carrapaticidas. Esses problemas podem ser minimizados com o tratamento do gado usando acaricidas. Contudo, o uso contínuo dos mesmos gera o problema da resistência nestes artrópodes³. Além de que agentes acaricidas são caros e causam contaminação ambiental.

Esse hospedeiro também transmite os agentes da “Tristeza Parasitária Bovina”, enfermidade responsável pelos maiores índices de mortalidade nos rebanhos. Serve de vetor para várias doenças como a babesiose bovina (*Babesia bovis* e *Babesia Bigemina*) e a anaplasmoze (*Anaplasma marginale*), constituindo-se nas duas principais enfermidades geradas pelo parasita. Os animais doentes apresentam sintomas de anemia, prostração, icterícia associados à febre.

Os carrapaticidas são os principais produtos utilizados para o controle do carrapato bovino até hoje. A correta manipulação dos mesmos é fundamental para o sucesso desse controle, porém a dependência exclusiva dos mesmos não deve ser preconizada. As principais classes de carrapaticidas são: arsenicais (óxido arsenioso), carbamatos (carbaril), organofosforados, piretróides, formamidinas (amitraz), fluazuron, flipronil e avermectinas. A Embrapa Gado de Corte, pesquisa o desenvolvimento de vacinas contra o carrapato a partir de uma proteína. Por enquanto, as vacinas disponíveis no mercado são importadas da Austrália e de Cuba e têm eficiência relativamente baixa. Isso evidencia a necessidade de desenvolver estudos nessa área tão importante biológica e economicamente.⁴

Ciclo de vida

Esse carrapato bovino apresenta duas etapas distintas no seu ciclo de vida (figura 4.1): **uma fase parasitária**, num período de 22 dias sobre um único hospedeiro e **uma fase não parasitária** que ocorre no solo podendo durar em média 2 a 3 meses.



Fonte: www.carrapatobovino.com⁵

Figura 4.1: Ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Na fase parasitária, o carrapato apresenta três características morfológicas distintas: larva, ninfa e adulto. A larva necessita de um hospedeiro para se fixar e sobrevive com as reservas de alimento acumuladas na fase de ovo. Com a alimentação e fixada ao hospedeiro inicia o processo de crescimento e desenvolvimento tegumentário, passando por um período latente entre o 4º e 5º dia. Em torno do 6º dia adquire uma nova estrutura, a ninfa, durando de 2 a 4 dias e mais mudanças no exoesqueleto ocorrem levando à forma adulta. Depois de 22 dias as fêmeas fecundadas caem do hospedeiro e os machos permanecem fixados podendo copular outras fêmeas.

Na fase não parasitária, estão os estágios de fêmea adulta (teleógina), ovo e larva infestante. Após a fêmea se desprender do animal procura um local apropriado para a posição dos ovos (temperatura em torno de 26°C, umidade >80%) que pode durar até 60 dias. Depois disso a fêmea atinge coloração amarelada e morre. Os ovos podem iniciar a eclosão a partir da 4ª semana após o início da postura. Depois ocorre a maturação das larvas e fixação ao hospedeiro.

Existem também outras espécies de carrapatos que atingem não somente os animais como também os humanos, como a Febre Maculosa Brasileira que tem como agente etiológico *Rickettsia rickettsii*. No contexto ecológico algumas espécies de carrapatos podem transmitir a *rickettsia* para determinadas categorias de animais silvestres, dentre eles o cachorro do mato, preás, roedores silvestres e os gambás. No Brasil, o carrapato estrela do cavalo (*Amblyomma cajennense*) é considerado o principal transmissor desta bactéria e está presente em todo território nacional. Relatos desta zoonose parecem estar limitados aos estados da região sudeste.

Terpenos são muito utilizados em indústrias como aromatizantes, flavorizantes, repelentes⁶ e muitas das plantas são ricas em limoneno na composição⁷. Em alguns estudos observa-se em plantas atividades acaricida⁸, repelente⁸⁻¹⁰, inseticida^{8,10} e pesticida. Segundo Jaenson⁸ em 2005 o limoneno também apresenta essas atividades, a atividade inseticida está no controle de ectoparasitas e em plantas sensíveis a insetos controle de ácaros e microorganismos. Frente a isso, foram testadas as atividades acaricidas do limoneno, do óxido do limoneno e dos derivados β -aminoálcoois.

2 OBJETIVO

Avaliar a existência de atividades ovicida e larvicida em carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* do limoneno, do óxido de limoneno e dos compostos sintetizados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os produtos testados (figura baixo) que foram sintetizados têm seus protocolos descritos no capítulo 1 deste trabalho.

Os resultados da atividade ovicida estão dispostos na tabela 4.2. Os brancos também foram feitos em triplicata utilizando somente etanol 96° (utilizado para diluição) e obteve-se 0% de mortalidade após as 48 horas do teste. Não foi utilizado padrão positivo já que não se tem nenhum produto comercializado para essas formas morfológicas do parasita.

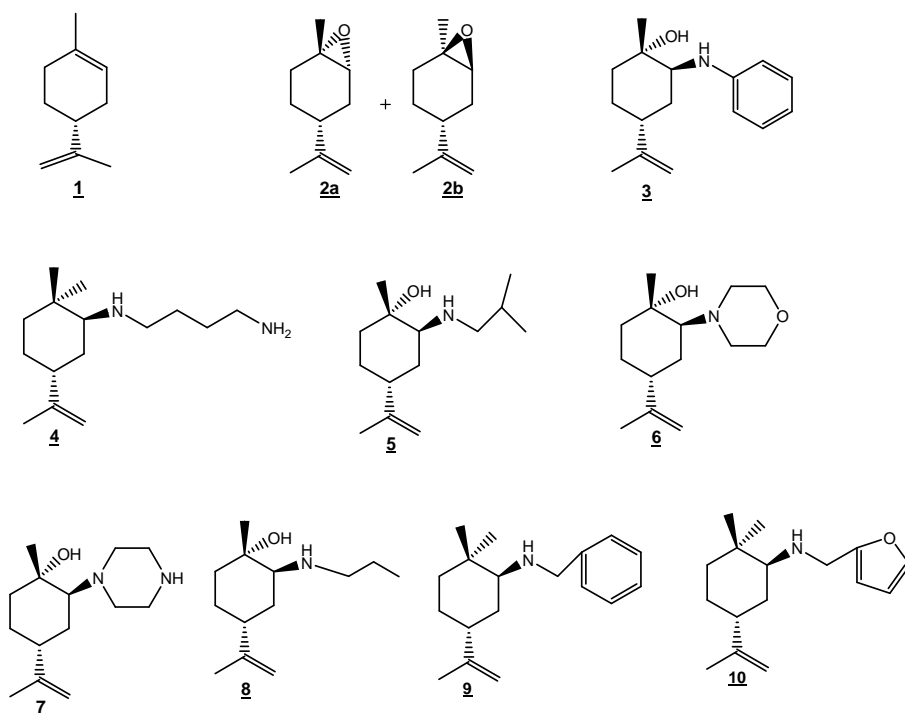


Figura 4.2: Produtos testados

Nesse estudo os produtos **2**, **6**, **8**, **9** e **10** apresentaram maior atividade que os demais compostos. A CIM dos compostos **4** e **5** está entre 0,3125 µg/mL e 0,150 µg/mL, muito baixas implicando em pouca atividade ovicida. Os outros compostos apresentaram atividade mais fraca, porém com a menor dosagem utilizada ainda impossibilitou a eclosão total de ovos.

Tabela 4.1: Resultados obtidos em índice de mortalidade (%) nos testes com os ovos do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Concentração Compostos	10µg/mL	5µg/mL	2.5 µg/mL	1.25 µg/mL	0.625 µg/mL	0.3125 µg/mL	0.150 µg/MI
1	99,3±1,2	89,3±1,2	90,0±10,0	91,0±3,6	75,0±5,0	10,0±17,3	6,7± 11,5
2	100	100	100	100	60,0±10,0	75,0±7,1	50,0±7,1
3	100	100	98,3±1,5	91,7±7,6	97,7±2,5	80,0±10,0	18,3± 7,6
4	100	16,7±5,8	25,0±5,0	5,7±5,7	6,7±11,5	3,3±5,8	0
5	100	100	100	100	6,7±11,5	3,3±5,8	0
6	100	100	100	96,0±5,3	89,7±9,5	96,7±5,8	45,0±35,4
7	100	100	100	100	96,7±5,8	83,3±15,3	16,7±28,9
8	100	100	96,7±5,8	96,3±3,5	88,3±7,6	83,8±15,3	33,3±15,3
9	100	94,0±4,6	97,0±3,6	100	80,0±1,7	65,0±5,0	33,3±15,3
10	100	85±13,2	91,7±7,6	100	100	93,3±11,5	23,3±2,9
Branco	0	0	0	0	0	0	0

Nos testes da avaliação larvicida observa-se também que o limoneno **1** é um dos compostos menos ativos, significando que as modificações estruturais realizadas em **1** foram benéficas para essa atividade. Sua atividade foi observada com a concentração mínima de 2,5 µg/ml e após a mortalidade foi de 0%. Isso também foi observado com os compostos **2**, **3**, **4** e **7** o que implica que a concentração inibitória mínima está entre 2,5 µg/mL e 1,25 µg/mL e testes posteriores serão efetuados para determiná-la. Os compostos com atividade mediana foram **5**, **6** e **8** com CIM entre 1,25 µg/mL e 0,625 µg/mL, já o **9** e **10** apresentaram melhores resultados.

Tabela 4.2: Resultados dos testes efetuados com as larvas desse carrapato bovino expresso com índice de mortalidade (%).

Concentração Compostos	10 µg/mL	5 µg/mL	2,5 µg/MI	1,25 µg/mL	0,625 µg/mL	0,3125 µg/mL	0,150 µg/mL
1	100	100	100	0	0	0	0
2	100	100	93.3 ±2.9	0	0	0	0
3	96.7±5.8	100	99.0±1.7	0	0	0	0
4	100	100	100	0	0	0	0
5	100	100	100	96.7±2.3	0	0	0
6	100	100	100	100	0	0	0
7	100	100	100	0	0	0	0
8	100	100	100	100	0	0	0
9	100	100	100	50	0	0	0
10	100	100	100	100	50	0	0
Branco 1	0	0	0	0	0	0	0

Como pode ser observado, os produtos com boa atividade ovicida **6**, **8**, **9** e **10** também apresentaram interessante atividade larvicida, implicando em ótimas substâncias para continuar o estudo com carrapatos. Os β -aminoálcoois apresentam potente atividade como agentes acaricidas até em doses menores que as apresentadas em vários experimentos realizados com ambas as larvas e ovos de *R. (B.) microplus*.^{11,12,13}

4 PARTE EXPERIMENTAL

4 PARTE EXPERIMENTAL

Os testes foram realizados no Laboratório de Entomologia da Faculdade de Veterinária-UFRGS com colaboração da professora Vera Lúcia Sarda Ribeiro e da professora Dr^a Gilsane Von Poser (Faculdade de Farmácia-UFRGS).

4.1 Compostos

Os produtos testados **2-10** foram sintetizados no LaSOM e estão descritos no capítulo 1 deste trabalho.

4.2 Preparação das amostras

Para o teste de imersão dos ovos e das larvas, os compostos foram diluídos serialmente em etanol 96°, respectivamente, em ordem para obter-se as concentrações de 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2.5 µg/mL, 1.25 µg/mL, 0,625 µg/mL, 0,3125 µg/mL e 0,150 µg/mL.

4.3 Preparação dos carrapatos

Coletaram-se fêmeas de *Rhipicephalus (B.) microplus*, medindo aproximadamente 4.5mm. Estas fêmeas foram lavadas com água e secas em papel toalha, e o peso médio foi de 0,30 g. Depois, foram incubadas a uma temperatura de 27-28 °C e umidade de 70-80% por aproximadamente duas semanas até a postura dos ovos. Esses ovos futuramente geram as larvas que são utilizadas para o teste larvicida.

4.4 Efeito na eclosão dos ovos

Aproximadamente 200 ovos férteis de *R. (B.) microplus* (0,01g) foram pesados em tubos de vidro e imersos por 5 minutos em 1 mL de solução teste contendo os produtos sintetizados (10 µg/mL, 5 µg/mL, 2.5 µg/mL, 1.25 µg/mL, 0,625 µg/mL,

0,3125 µg/mL e 0,150 µg/mL). As soluções foram removidas e após a evaporação do solvente os tubos foram fechados com algodão e incubados a 27–28°C e 70–80% de umidade relativa por aproximadamente 14 dias, até o início da eclosão dos ovos. O branco foi feito com o mesmo etanol utilizado nas diluições seriadas. Todas as concentrações, inclusive o branco, foram realizadas em triplicata. E as análises estatísticas foram efetuadas com o teste ANOVA.

4.5 Teste de imersão das larvas

O experimento foi realizado com *R. (B.) microplus*. Pesou-se aproximadamente 100 ovos férteis (0,005g) em sacos de tecido do tipo TNT (1,0cm x 1,5cm) (ver figura 4.3). Os sacos foram encubados a 27-28°C e 70-80% de umidade relativa por aproximadamente 14 dias, até a eclosão dos ovos. Após mais 14 dias de incubação, os sacos que continham as larvas prontas para o teste foram imersos por 5 minutos em 10- 20 ml de solução contendo os produtos sintetizados (10 µg/mL, 5 µg/mL, 2.5 µg/mL, 1.25 µg/mL, 0,625 µg/mL, 0,3125 µg/mL e 0,150 µg/mL). O controle foi feito com o mesmo etanol utilizado para as diluições seriadas. Após aproximadamente 1 hora, tempo para evaporar o solvente, os sacos foram incubados a 27-28°C e 70-80% de umidade relativa por 48 horas. Larvas vivas e mortas foram contadas para calcular-se posteriormente o percentual de mortalidade. Todas as concentrações testadas, inclusive o branco, foram realizadas em triplicata. E as análises estatísticas foram efetuadas com o teste ANOVA.



Figura 4.3: Larvas dentro dos saquinhos para serem utilizadas

5 CONCLUSÃO

Frente ao teste ovicida os compostos **2**, **6**, **8**, **9** e **10** foram os mais ativos, impedindo a eclosão total ou quase total dos ovos na menor dose utilizada (0,150 µg/ml). Porém, serão necessários mais testes para elucidar a CIM desses compostos e dos menos ativos como **1**, **3** e **7** já que houve eclosão dos ovos em todas as doses utilizadas. A CIM foi definida entre 0,3125 µg/ml e 0,150 µl/ml para os compostos **4** e **5**. Nos testes larvicidas, os compostos **6**, **8**, **9** e **10** foram os mais ativos e o CIM pode ser definido entre todos os compostos. Os estudos relatados são preliminares, mas fornecem uma indicação de que os β-aminoálcoois apresentam potente atividade como agentes acaricidas com larvas e ovos de *R. (B.) microplus*.

Este é o primeiro relato da avaliação carrapaticida de limoneno, óxido de limoneno e dos β-aminoálcoois do limoneno para a espécie de carrapato *Rhipichephalus (Boophilus) microplus*.

6 REFERÊNCIAS

1. GARCÍA-GARCÍA, J.C.; GONZALEZ, I.L.; GONZÁLEZ, D. M.; VALDÉS, M.; MÉNDEZ, L.; LAMBERTE, J.; D'AGOSTINO, B.; CITRONI, D.; FRAGOSO, H.; ORTIZ, M.; RODRÍGUEZ, M.; DE LA FUENTE, J. Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. **Biomedical Life Science**, v. 23, p.883-895, 1999.
2. DUCORNEZ, S.; BARRÉ, N.; MILLER, R.J; DE GARINE-WICHATISKY, M. Diagnosis of amitraz resistance in *Boophilus microplus* in New Caledonia with modified Larval Packet Test. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p. 285-292, 2005.
3. KLAFKE, G.M.; SABATINI, G.A.; ALBUQUERQUE T.A.; MARTINS J.R.; KEMP, D.H.; MILLER, R.J; SCHUMAKER, T.T.S. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p.386–390, 2006.
4. Folha do Estado de São Paulo acessado em 10/02/08.
5. Site www.carrapatobovino.com, acessado em 17/01/08.
6. CHOOCHOTE, W.; CHAITHONG, U.; KAMSUK, K.; JITPAKDI, A.; TIPPAWANGKOSOL, P.; TUETUN, B.; CHAMPAKAEW, D.; PITASAWAT, B. Repellent activity of selected essential oils against *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v.78, p. 359-364, 2007.
7. BELANGER, A.; DEXTRACE, L.; ISNARDI, M.J.; CHALCHAT, J.C.; GARRY, R.P.; COLLIN, G. Chemical composition of essential oil and headspace of the Quebec 'myrique baumier' wax myrtle (*Myrica gale* L.). Influence of the extraction process. **Journal of Essential Oil Research**, v.9, p. 657-662, 1997.
8. JAENSON, T.G.T.; PÄLSON, K.; BORG-KARLSSON, A.-K. Evaluation of extracts and oils of tick-repellent plants from Sweden. **Medical and Veterinary Entomology**, v.19, p. 345-352, 2005.
9. STUART, A.E. Paralysis *culicoides impunctatus* after exposure to oil of *Myrica gale*. **Proceedings of the Royal College of Physicians**, v.20, p.463-466, 1990.
10. IBRAHIM, M.A.; KAINULAINEN, P.; AFLATUNI, A.; TIILIKKALA, K.; HOLOPAINEN, J.K. Insecticidal, repellent, antimicrobial, and phytotoxicity of essential oil: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. **Agricultural Food Science Finland**, v.10, p.243-259, 2001.
11. CHAGAS A.C.S.; PASSOS W.M.; PRATES H.T.; LEITE R.C.; FURLONG J.; FORTES I.C.P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, p.247-253, 2002.

12. RIBEIRO V.L.S.; TOIGO E.; BORDIGNON S.A.L.; GONÇALVES K.; VON POSER G.L. Acaricidal properties of extracts from the aerial parts of *Hypericum polyanthemum* on the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v.147, p.199-203, 2007.

13. RIBEIRO V.L.S, AVANCINI C., GONÇALVES K., TOIGO E., VON POSER G.L. Investigation of the acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, v.151, p. 351-354, 2008.

1 INTRODUÇÃO- Atividade Leishmanicida

1 INTRODUÇÃO- Atividade leishmanicida

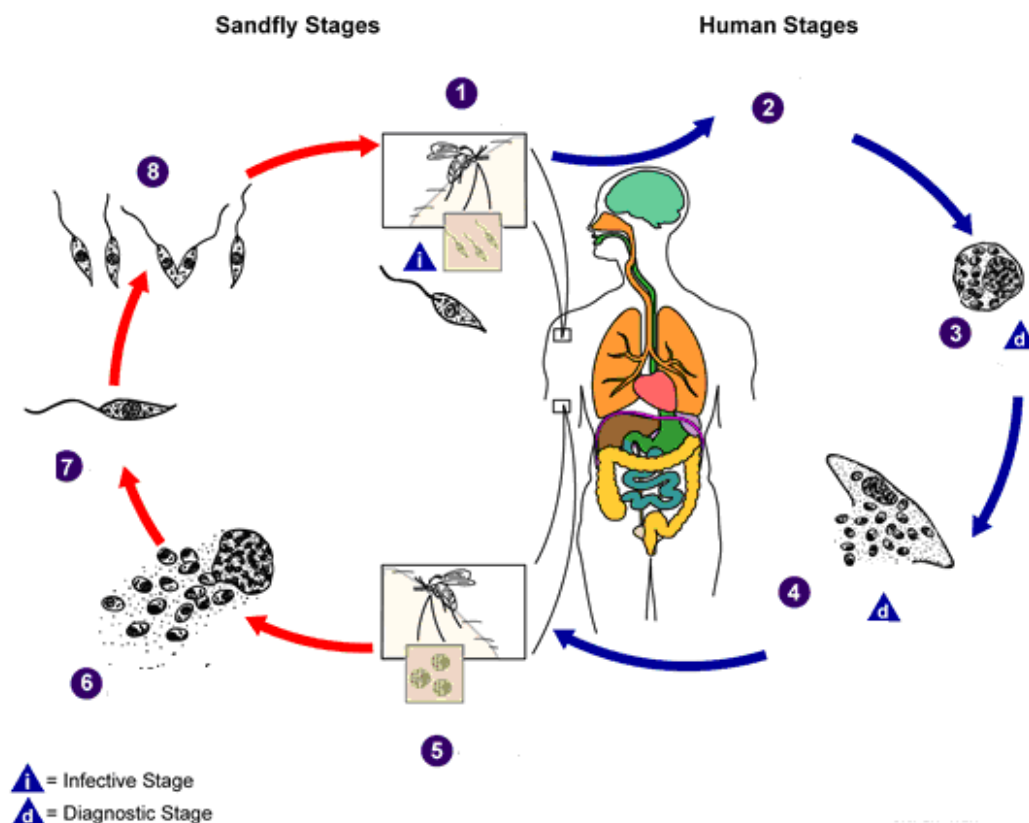
A leishmaniose é uma doença provocada pelos parasitas unicelulares do gênero *Leishmania* afetando mais de 12 milhões de pessoas e colocando em risco a saúde de 350 milhões em cerca de 88 países do mundo¹. Existem três tipos de leishmaniose: visceral (ataca os órgãos internos) causada por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, endêmica nos continentes da Ásia, Europa e América^{2,3,4} com disseminação em outras áreas,^{5,6} cutânea e mucocutânea (mucosas e a pele).^{7,8} As duas últimas formas podem causar lesões permanentes nos pacientes e, se não tratadas, podem evoluir para a forma visceral da doença, a qual é fatal ao paciente pela queda da resposta imune com a morte dos macrófagos infectados.

Existem quatorze espécies patogênicas para o ser humano. As mais importantes são:

As espécies *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi* que podem produzir a leishmaniose visceral, mas, em casos leves, apenas manifestações cutâneas.

As espécies *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. peruviana* que produzem a leishmaniose cutânea ou a mais grave, mucocutânea.

Embora o ciclo de vida das espécies (Figura 3.1) seja ligeiramente diferente, há pontos comuns entre elas. São libertados no sangue pela picada de dois gêneros de mosquitos: *Lutzomyia* e *Phlebotomus*. As leishmanias na forma de promastigotas (1) ligam-se por receptores específicos aos macrófagos, pelos quais são fagocitadas (2). Elas são imunes aos ácidos e enzimas dos lisossomos com que os macrófagos tentam digeri-las, e transformam-se nas formas amastigotas (3) após algumas horas (cerca de 12h). Em seguida, começam a multiplicar-se por divisão binária (4), saindo para o sangue ou linfa por exocitose e por fim conduzem à destruição da célula, invadindo mais macrófagos tornando-se uma infecção sintomática resultando em leishmaniose cutânea ou visceral. O inseto transmissor picando o paciente ingere formas amastigotas (5,6) que demoram oito dias ou mais para se transformarem em promastigotas (7) e multiplicarem-se no seu intestino, migrando depois para as proboscis (8) infectando novo ser humano com sua picada, reiniciando o ciclo.



fonte: <http://www.cdc.gov/>¹⁰

Figura 5.1: Ciclo de vida da Leishmaniose.

O tratamento é efetuado por administração de compostos antimoniais (stibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina), pentamidina, anfotericina B lipossomal e miltefosina (hexadecilfosfocolina). Entretanto, eles apresentam problemas em termos de vias de administração, duração do tratamento (normalmente 3-4 semanas), alta toxicidade e custo, limitando o uso destes tratamentos nas áreas endêmicas da doença, o que torna a busca por novos agentes leishmanicidas uma prioridade.⁷⁻⁹

Óleos essenciais são importantes alternativas para terapias antiparasitárias, eles têm sido usados como auxiliar em infecções por parasitas.¹¹ o extrato do limão, um fruto que tem o limoneno como seu componente majoritário, apresentou atividade antiparasitária *in vivo* contra *T. gallinarum* e *H. meleagridis*.¹² Então, estudar o limoneno e seus derivados sintéticos é uma boa estratégia em busca de novas alternativas de tratamento.

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

Avaliar a existência de atividade leishmanicida *in vitro* do *template* - limoneno – e de alguns derivados β -aminoálcoois sintetizados frente a formas promastigotas de *Leishmania (Vianna) braziliensis*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os produtos testados *in vitro* frente à forma promastigota de *Leishmania (Vianna) braziliensis*, empregando como padrão o isotionato de pentamidina, encontram-se listados na figura 3.2. O derivado aziridina **3** foi sintetizado por J. Limberger¹³ e incluído no teste a fim de se verificar a influência do anel nitrogenado na atividade.

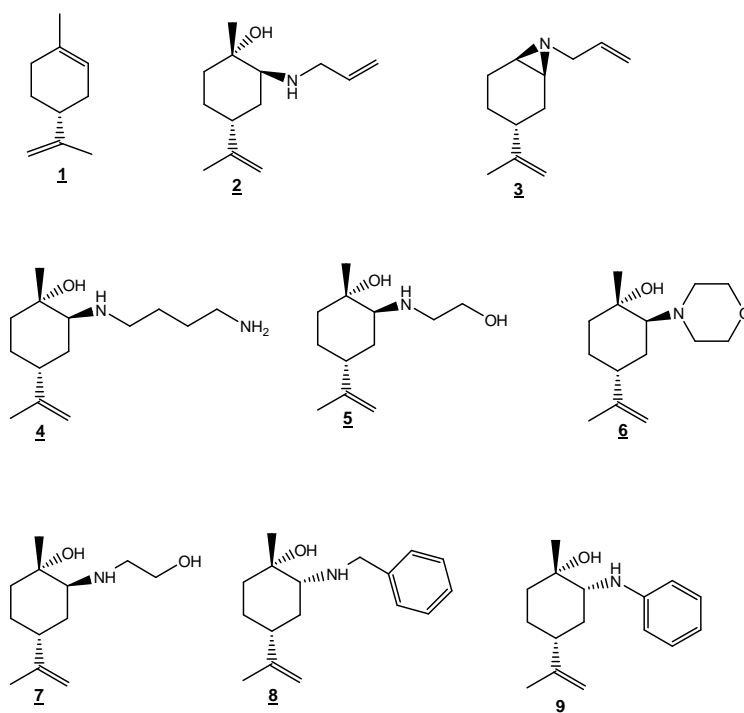


Figura 5.2: Produtos testados para a atividade leishmanicida

A atividade leishmanicida encontrada nesse trabalho está demonstrada na tabela abaixo. Dentre os sete β -aminoálcoois testados dois deles foram mais ativos que o padrão ($48,5 \pm 28,7 \mu\text{M}$) e cinco foram mais ativos que o limoneno **1**. O Limoneno **1** nesse teste se mostrou inativo ($876,2 \pm 216 \mu\text{M}$) demonstrando que este terpeno isolado não é um bom antiparasitário contra formas promastigotas de *Leishmania (Vianna) braziliensis*.

Tabela 5.1: Resultados obtidos nos testes efetuados nesse estudo.

Compostos	LD ₅₀ (µM)*
<u>1</u>	876,2 ± 216
<u>2</u>	76,5 ± 13,9
<u>3</u>	510,0 ± 92,5
<u>4</u>	>1330
<u>5</u>	1042,6 ± 65,2
<u>6</u>	>1333
<u>7</u>	0,71 ± 0,095
<u>8</u>	830,7 ± 185
<u>9</u>	0,408 ± 0,01
Pentamidina	48,5 ± 28,7

*LD₅₀ (µM): dose letal mediana é a quantidade de uma determinada substância necessária para provocar a morte de 50% da população em estudo.

De fato, os derivados n-propila 7 (0,71 ± 0,095 µM) e fenila 9 (0,408 ± 0,02 µM) exibiram poderosas atividades. O caráter lipofílico dos substituintes parece ser importante a fim de interagir com o parasita onde com compostos muito lipofílicos 8 e muito hidrofílicos 4 a atividade não foi observada. Pode-se observar claramente que quando a atividade dos compostos diminui a polaridade aumenta. Os três derivados menos ativos foram 4 com cadeia putrescina, 5 com etanolamina e, 6 com anel da morfolina apresentando nenhuma atividade na maior concentração utilizada no ensaio.

O volume do substituinte é outro aspecto importante, uma vez que o composto 8 contendo grupamento benzilamina (830,7 ± 185 µM) foi menos ativo que o β-aminoálcool 9 com anilina (0,408 ± 0,01 µM). Também foi observado que a alilaziridina 3 apresentou um baixo desempenho ao mesmo teste (510,0 ± 92,5 µM) levando em consideração o resultado obtido com a 2 (76,5 ± 13,9 µM), as modificações estruturais no anel cicloexeno causado pela adição do núcleo aziridina, que constitui um novo sistema biciclo tenso pode ser responsável pela redução da atividade. Futuras investigações devem ser realizadas a fim de esclarecer essa falta de atividade.

Os resultados obtidos com esse trabalho são preliminares e não podem estabelecer um estudo de relação-atividade de compostos. No entanto, eles

caracterizam que a introdução de heteroátomo como o nitrogênio na porção endocíclica do limoneno demonstram promissora atividade para leishmania.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4 PARTE EXPERIMENTAL

Os testes para a determinação da atividade leishmanicida dos compostos foram realizados no Centro de Referência em Leishmanioses (CRLeish) do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Cunha da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, sob a coordenação da Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Madeira.

Para os ensaios utilizaram-se formas promastigotas de *Leishmania* (Vianna) *brasiliensis* (MCAN/BR/98/R.619) obtidas do banco de amostras do Serviço de Parasitologia/IPEC/Fiocruz em fase infectiva. Os parasitas foram mantidos *in vitro* em meio Schneider's *Drosophila medium* (pH 7,2) suplementado com 10% de soro fetal bovino a 26 °C em estufa biológica, sendo utilizados somente até a quinta passagem para garantir a infectividade dos parasitas nos ensaios. Em fase log da curva de crescimento (quarto dia), a cultura foi centrifugada (4000 rpm, 10 min, 4 °C) e o sedimento foi ressuspenso em 1 mL do sobrenadante da mesma cultura, quantificada em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para 2×10^6 promastigotas/mL. Os compostos foram dissolvidos em DMSO para concentração estoque de 10 mg/mL e conservados à temperatura de 4 °C até o momento do uso. Nos ensaios utilizaram-se as concentrações de 0,156 µg/mL a 320 µg/mL.

A determinação da atividade leishmanicida foi realizada em placas para cultura de 96 poços. Um volume de 100 µL da suspensão de parasitas (2×10^5 promastigotas) foi colocado nos poços em triplicatas, com o mesmo volume dos compostos diluídos. O controle utilizado foram parasitas sem adição de qualquer outra substância; parasitas com isotionato de pentamidina (320 µg/mL) e parasitas expostos à concentração de 1,4% do solvente, que foi a concentração utilizada nos ensaios. Tal concentração não possui efeito lesivo sobre os parasitas. A incubação foi feita a 26 °C em estufa biológica e após 24 horas os parasitas foram quantificados em câmara de Neubauer empregando corante vital (Azul de Triptan 0,1 em PBS). As atividades foram expressas em LD₅₀ (µg/mL), indicando a concentração necessária para a inibição de 50% do crescimento de formas promastigotas de *L. braziliensis*. Os valores obtidos a partir da contagem dos parasitas foram plotados de forma gráfica no software Microsoft Office Excel® e analisados pelo teste *t* de Student. Para os testes de significância estatística,

considerando os valores de $p \leq 0,05$ foi empregado o teste ANOVA seguido pelo teste Student-Newman-Keuis e Kuskall-Wallis do software SPSS for Windows®.

5 CONCLUSÃO

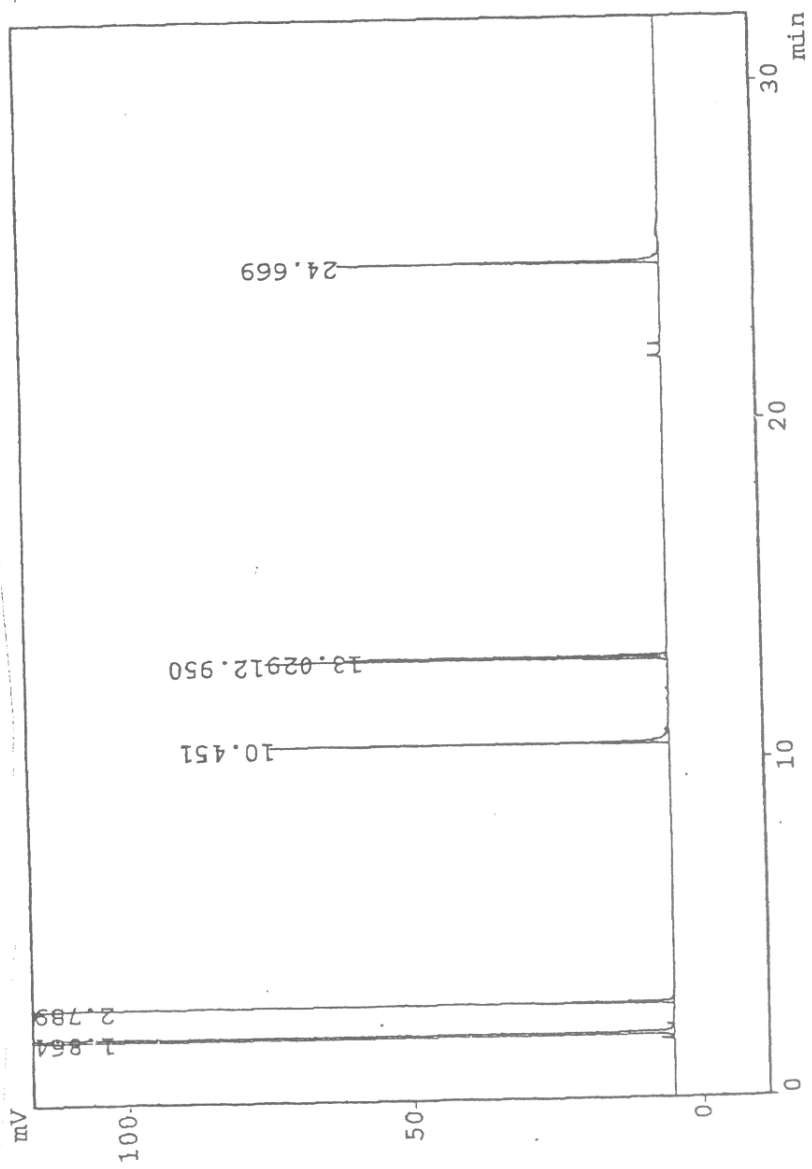
Neste trabalho foi demonstrada uma excelente atividade *in vitro* para derivados β -aminoálcoois do *R*-(+)-Limoneno contra as formas promastigotas de *Leishmania (Vianna) braziliensis*.

A interessante atividade de alguns compostos contra essas formas é de extremo interesse. A utilização de um modelo natural, econômico e amplamente encontrado, gerando compostos biologicamente ativos em poucas etapas sintéticas é uma boa estratégia para a descoberta de novos *leads*. Outros ensaios farmacológicos estão em andamento com o objetivo de investigar o mecanismo de ação desses derivados. Este é o primeiro relato de atividade leishmanicida para derivados β -aminoálcoois do limoneno, bem como da inatividade do limoneno.

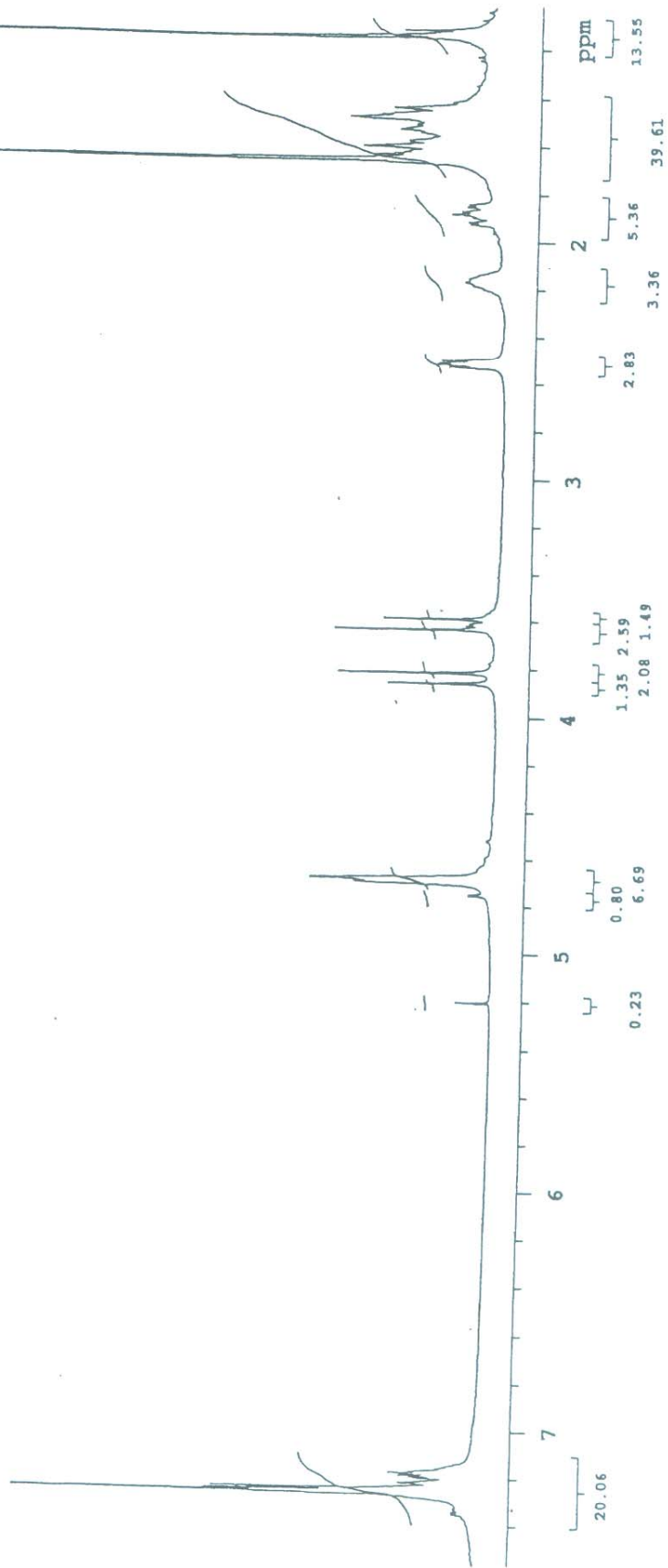
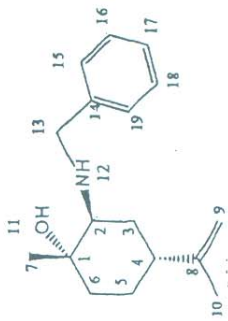
6 REFERÊNCIAS

1. ESFANDIARPOUR, I.; DABIRI, S.H.; YOUSEFI, K. Dry tipe leishmanial lymphadenitis presented as two large parotid and cervical masses. **International Journal of dermatology**, v. 46, p. 711-714, 2007.
2. HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 354, p. 1191-1199, 1999.
3. CORRÊA, A.P.F.L.; DOSSI, A.C.S.; VASCONCELOS, R.O.; MUNARI, D.P.; LIMA, V.M.F. Evolution of transformation growth factor β 1, interleukin-10, and interferon- γ in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v.143, p.267-274, 2007.
4. PEARSON, R.D.; SOUZA, A.Q., Clinical spectrum of leishmaniosis. **Clinical Infectious Diseases**, v.22, p. 1-13, 1996.
5. ENSERINK, M., Infectious diseases. Has leishmaniasis become endemic in the US? **Science**, v. 290, p.1881-1883, 2000.
6. SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.; PACHECO, R.S.; FIÚSA, V.O.; BRAZIL, R.P. Visceral leishmaniasis Metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p. 285-291, 2001.
7. CROFT, S. L.; COOMBS, G.H. Leishmaniasis - current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitology**, v. 19, p. 502-508, 2003.
8. MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVA, N. G. **The Lancet**, v. 366, p. 9496, 1561, 2005.
9. Drugs for Neglected Diseases Initiative. Disponível em <<http://www.dndi.org/>> acessado em 02/01/2008.
10. Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em <<http://www.cdc.gov/>> acessado em 15/05/2008.
11. JONES, F.A. Herbs - useful plants. Their role in history and today. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v.8, p.1227-1231, 1996.
12. ZENNER, L.; CALLAIT M.P.; GRANIER C.; CHAUVE C. *In vitro* effect of essential oils from *Cinnamomum aromaticum*, *Citrus limon*, and *Allium sativum* on two intestinal flagellates of poultry *Tetratrichomonas gallinarum* and *Histomonas meleagridis*. **Parasite**, v.10, p. 153-157, 2003.
13. LIMBERGER, J. Carbonilação catalítica de alilaminoálcoois: síntese de hidróxigama-lactamas e oxazolidinas bicíclicas. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

IV ANEXOS



Anexo 1a: CG da reação do produto 2-(benzilamino)-4-isopropenil-1-metilcicloexanol.



Anexo 1b: ¹H-RMN do produto 2-(benzilamino)-4-isopropenil-1-metilcicloexanol.

Attached proton test experiment

File: Apt

Pulse Sequence: APT

Solvent: cdcl3

Temp. 24.0 C / 297.1 K

Operator: Joyce

INOVA-300 "inova300.iq.ufrgs.br"

Relax. delay 1.000 sec

1st pulse 90.0 degrees

2nd pulse 135.0 degrees

Acq. time 1.000 sec

Width 18103.6 Hz

6800 repetitions

OBSERVE C13, 75.4241601 MHz

DECOUPLE H1, 299.9581231 MHz

Power 37 dB

on during acquisition

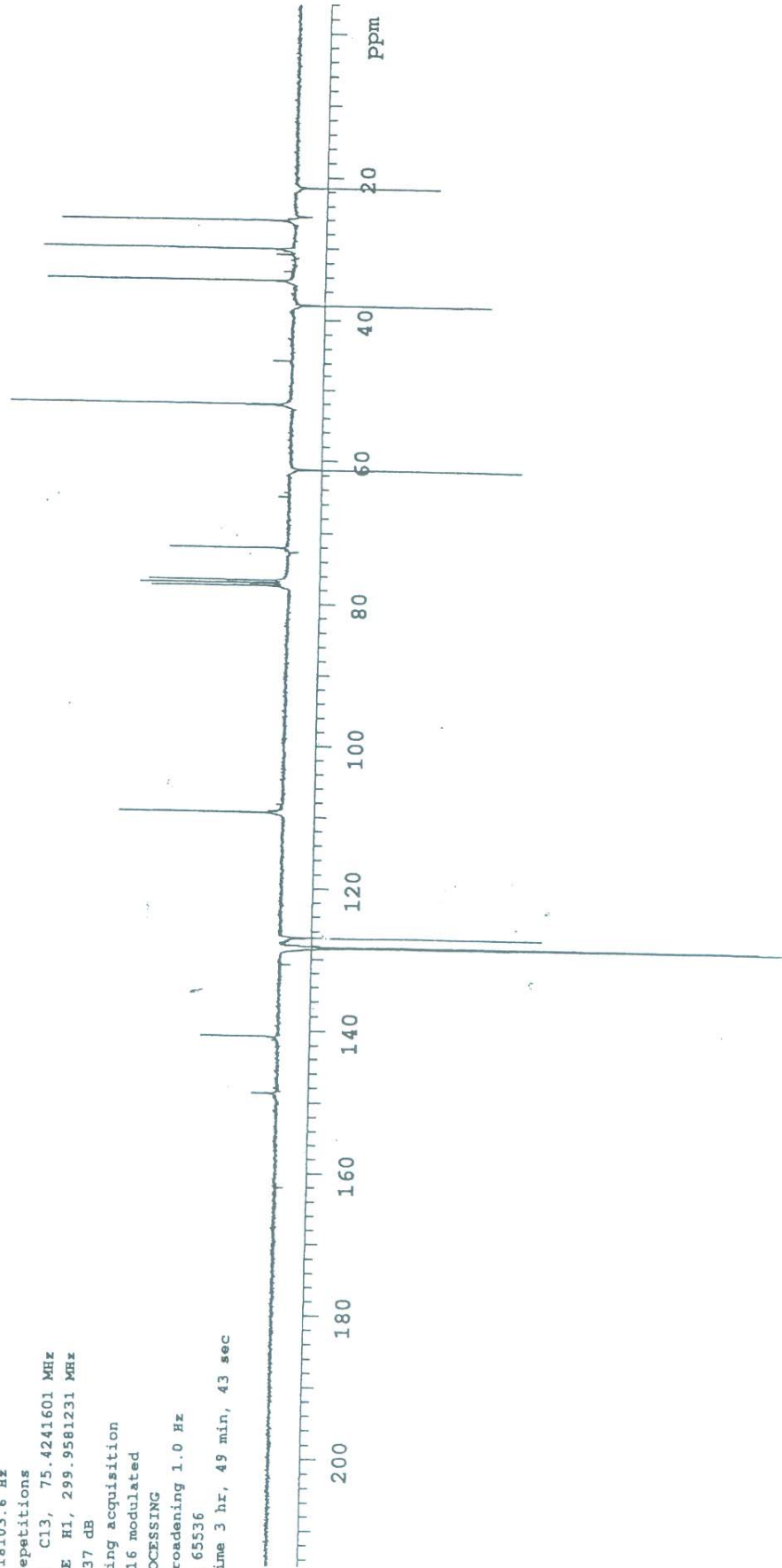
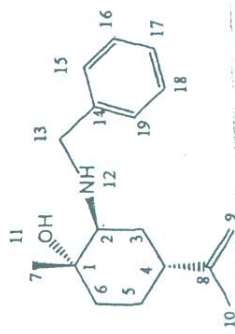
WALTZ-16 modulated

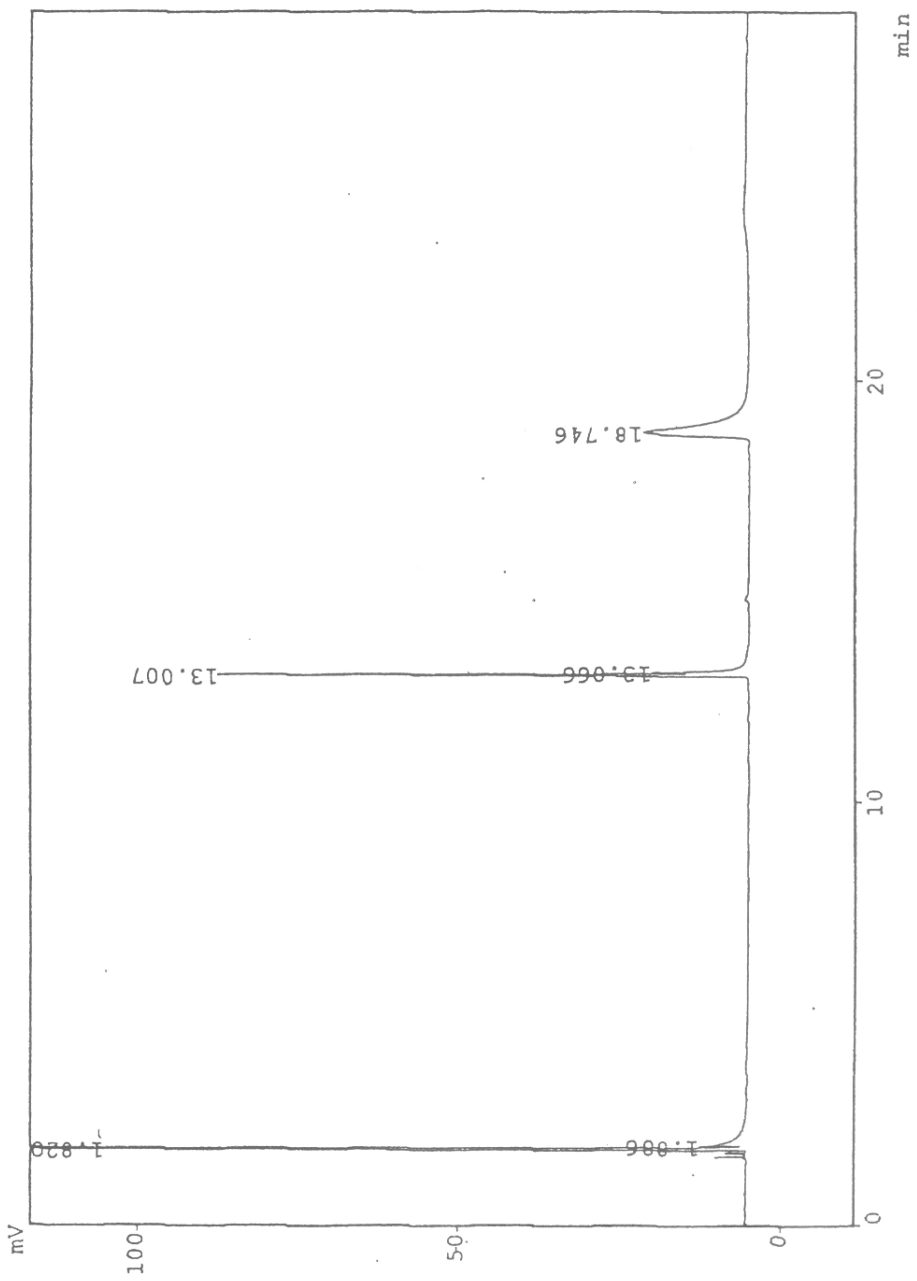
DATA PROCESSING

Line broadening 1.0 Hz

FT size 65536

Total time 3 hr, 49 min, 43 sec





Anexo 2a: CG da reação do produto 2-(propilamino)-4-isopropenil-1-metilcicloexanol.

Std proton

File: Proton

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: cdcl3

Temp. 24.0 C / 297.1 K

Operator: joyce

INOVA-300 "inova300.iq.vfrgs.br"

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 2.049 sec

Width 4799.3 Hz

32 repetitions

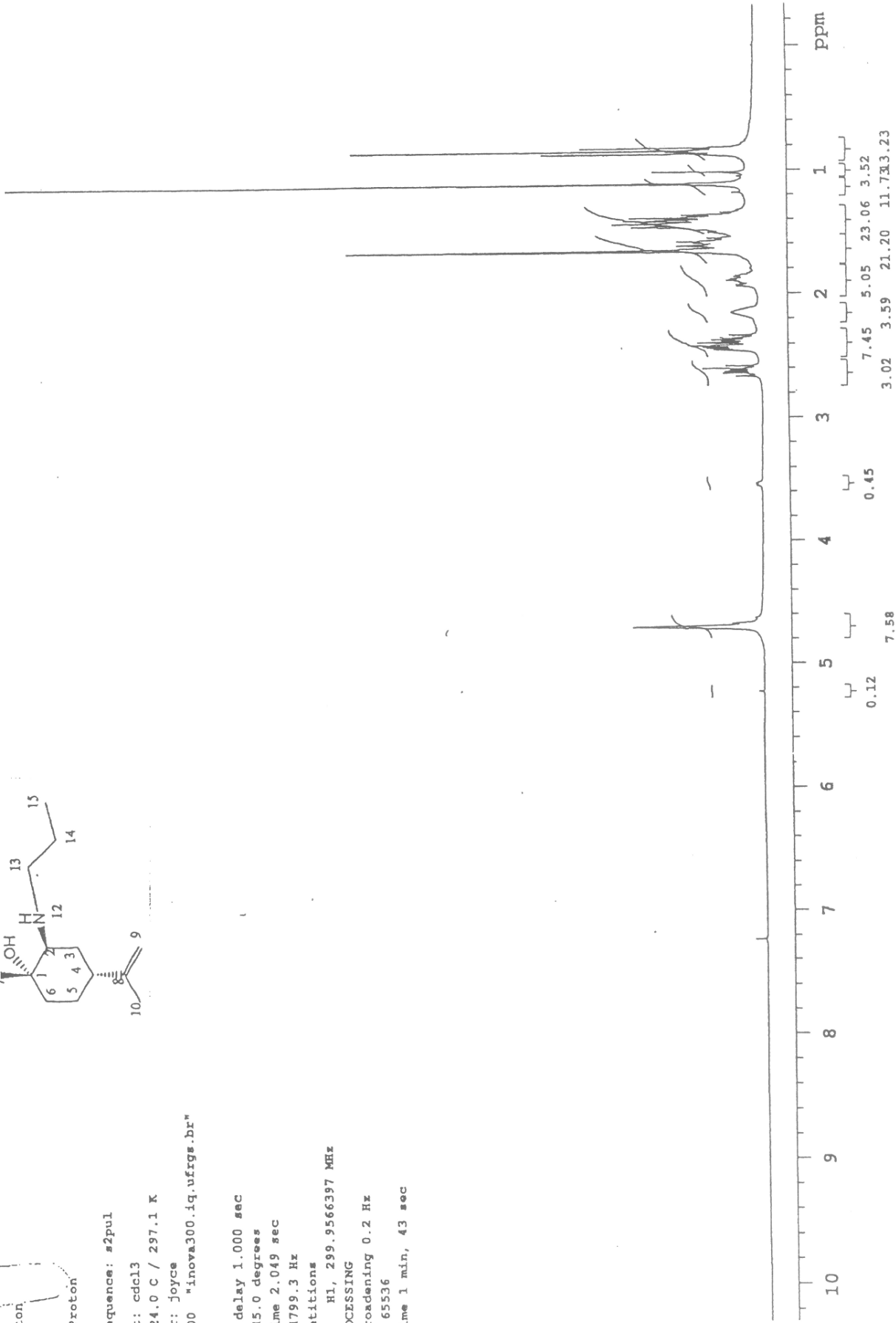
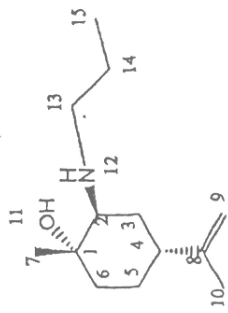
OBSERVE H1, 299.9566397 MHz

DATA PROCESSING

Line broadening 0.2 Hz

FT size 65536

Total time 1 min, 43 sec



Anexo 2b: ¹H-RMN do produto 2-(propilamino)-4-isopropenil-1-metilciclohexanol.

Attached proton test experiment

File: Apt

Pulse Sequence: APT

Solvent: cdcl3

Temp. 24.0 C / 297.1 K

Operator: joyce

INOVA-300 "inova300.iq.ufrgs.br"

Relax. delay 1.000 sec

1st pulse 90.0 degrees

2nd pulse 135.0 degrees

Acq. time 1.000 sec

Width 18103.6 Hz

2000 repetitions

OBSERVE C13, 75.4241614 MHz

DECUPLE H1, 299.9581231 MHz

Power 37 dB

on during acquisition

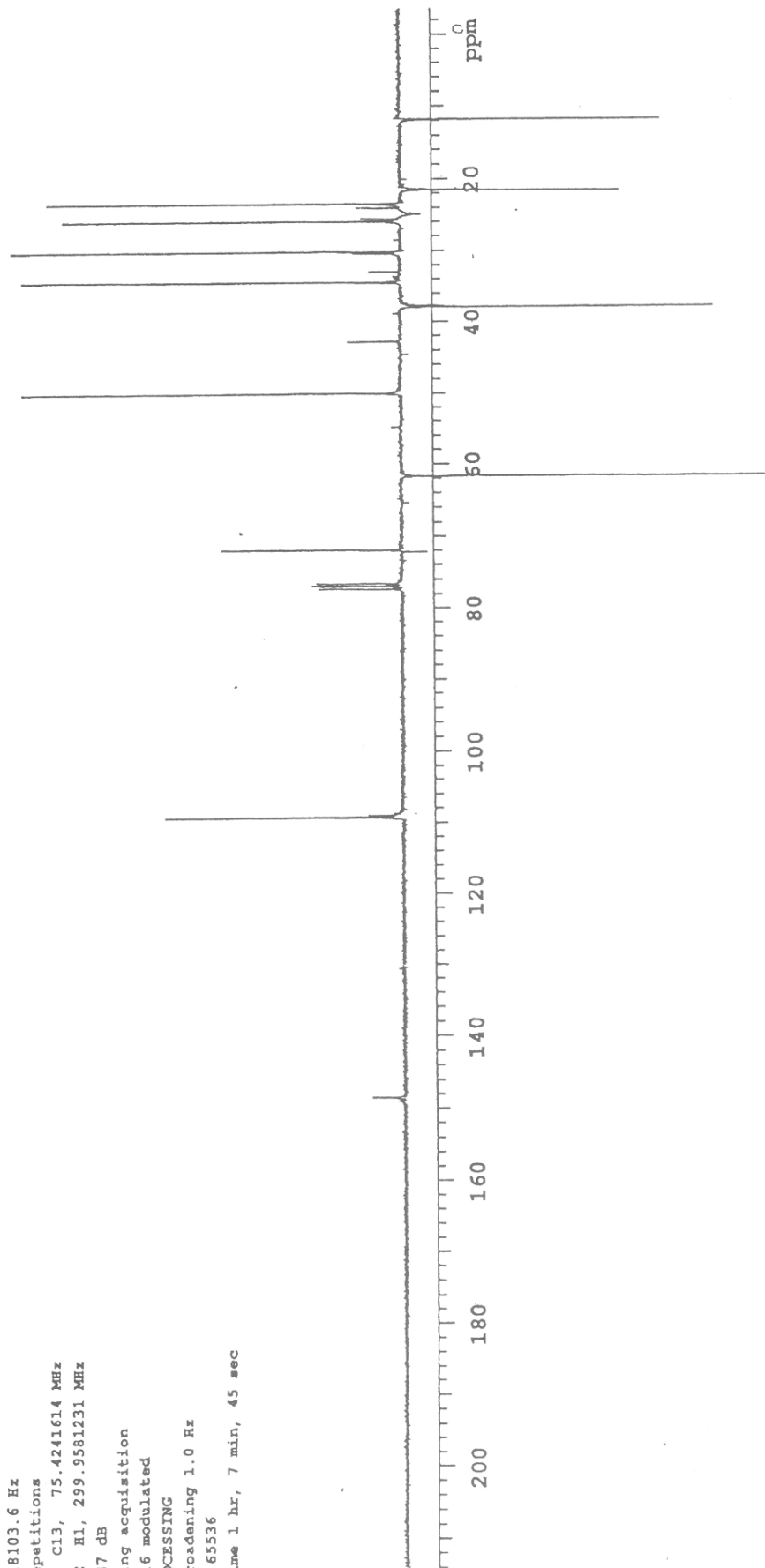
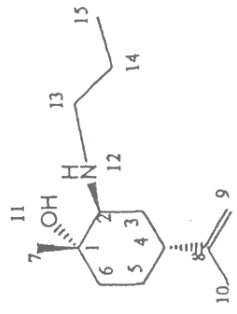
WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

Line broadening 1.0 Hz

FT size 65536

Total time 1 hr, 7 min, 45 sec



Anexo 2c: ¹³C-RMN do produto 2-(propilamino)-4-isopropenil-1-metilcicloexanol.